UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1963

N° 210

ESSAI D'APPLICATION

DE LA

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE A QUELQUES LIPIDES BIOLOGIQUES

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse (Professeur P. VALDIGUIÉ).

●

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement en Juin 1963

par

Jean-Louis LEGRAND

Pharmacien
Assistant de Biochimie
Lauréat de la Faculté

MEMBRES DU JURY

MM.	VALDIGUIÉ,	*Président*
	BOURBON,	*Assesseurs*
	DOUSTE-BLAZY,	—
	BRU,	—
	BROUSSY,	*Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DES CAPITOULS
9, Rue d'Astorg

1963

LEGRAND (Jean-Louis)
Essai d'Application
de la Chromatographie en couche
mince à quelques Lipides biologiques
Toulouse - Imprimerie des Capitouls.
1963 - in 8° - 144 pages.
Thèse de Pharmacie, Toulouse
N° 210

LEGRAND (Jean-Louis)
Essai d'Application
de la Chromatographie en couche
mince à quelques Lipides biologiques
Toulouse - Imprimerie des Capitouls.
1963 - in 8° - 144 pages.
Thèse de Pharmacie, Toulouse
N° 210

LEGRAND (Jean-Louis)
Essai d'Application
de la Chromatographie en couche
mince à quelques Lipides biologiques
Toulouse - Imprimerie des Capitouls.
1963 - in 8° - 144 pages.
Thèse de Pharmacie, Toulouse
N° 210

LEGRAND (Jean-Louis)
Essai d'Application
de la Chromatographie en couche
mince à quelques Lipides biologiques
Toulouse - Imprimerie des Capitouls.
1963 - in 8° - 144 pages.
Thèse de Pharmacie, Toulouse
N° 210

ESSAI D'APPLICATION

DE LA

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

A QUELQUES LIPIDES BIOLOGIQUES

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0073

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1963

N° 210

ESSAI D'APPLICATION

DE LA

CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE A QUELQUES LIPIDES BIOLOGIQUES

Travail du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Toulouse (Professeur P. VALDIGUIÉ).

●

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement en Juin 1963

par

Jean-Louis LEGRAND

Pharmacien
Assistant de Biochimie
Lauréat de la Faculté

MEMBRES DU JURY

MM.	VALDIGUIÉ,	*Président*
	BOURBON,	*Assesseurs*
	DOUSTE-BLAZY,	—
	BRU,	—
	BROUSSY,	*Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DES CAPITOULS
9, Rue d'Astorg

1963

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen. . . . . MM. LAZORTHES.
Assesseurs. . . . . BLANC, SOREL.
Doyens honoraires. . . . . GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER.

Professeurs honoraires :

MM. RIBAUT, VALLOIS, TAPIE, DELAS, RISER.

SECTION MÉDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale.	MM. MÉRIEL. GADRAT.
Clinique chirurgicale et Gynécologique.	FABRE (P.).
Clinique chirurgicale et du Cancer.	GRIMOUD.
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie.	VIRENQUE.
Clinique des Maladies cutanées et syphilitiques.	BAZEX.
Clinique des Maladies de la Tuberculose et Pathologie interne. . . .	MOREL.
Clinique des Maladies des Voies urinaires.	LHEZ.
Clinique médicale infantile et Puériculture.	SOREL.
Clinique Médicale de la première enfance.	BARDIER.
Clinique de Neurologie et Psychiatrie.	GÉRAUD.
Clinique obstétricale.	GUILHEM (P.).
Clinique odonto-stomatologique. . .	CADENAT (H.).
Clinique ophtalmologique.	CALMETTES.
Clinique O.R.L. et de Chirurgie maxillo-faciale.	CALVET.
Clinique rhumatologique.	RUFFIÉ (R.).
Clinique traumatologique des membres.	RIEUNAU.
Accouchement et obstétricie sociale.	PONTONNIER.
Anatomie.	LAZORTHES.
Anatomie appliquée.	POULHÈS.
Anatomie pathologique.	FABRE (J.).
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale.	ANDRIEU.
Chimie biologique.	VALDIGUIÉ.
Electro-Radiologie.	MARQUÈS.
Embryologie générale.	BROUSSY (J.).
Histologie.	BIMES.
Hydrologie thérapeutique et Climatologie.	DARNAUD.
Médecine Légale et du Travail. . .	PLANQUES.
Médecine Sociale.	BONHOURE.
Parasitologie.	BOUISSET.
Pathologie chirurgicale.	DAMBRIN.
Pathologie générale et Médecine expérimentale.	SENDRAIL.
Physico-Chimie.	AUVERGNAT.
Physiologie.	LAPORTE (Y.).
Physiologie appliquée et Pharmacologie.	BAISSET.
Physique biologique et médicale. .	BUGNARD.
Propédeutique médicale.	LAPORTE (J.).
Thérapeutique.	DARDENNE.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée. .	M. COULOUMA.
Bactériologie.	Mme ENJALBERT.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale.	DOUSTE-BLAZY.
Histologie et embryologie.	PLANEL.
Ophtalmologie.	DÉODATI.
Parasitologie.	RUFFIÉ (J.).
Physiologie.	MONTASTRUC.
Physique médicale.	BRU.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Anatomie.	MM. BASTIDE.
Anatomie pathologique.	BOUISSOU.
Anesthésiologie.	LARENG.
Carcinologie.	ESTRADE.
Chirurgie générale.	GÉDÉON.
Electroradiologie.	PONS.
Hématologie.	DUCOS.
Histologie et embriologie.	GUILHEM (A.).
Médecine générale.	MONNIER.
O.R.L.	CLAUX.
Pathologie expérimentale.	GLEIZES.
Physiologie.	BESSOU.
Physique médicale.	COMMANAY.

AGRÉGÉS

Médecine générale.	MM. RIBAUT. CALAZEL. RASCOL. LE TALLEC. RIBET.
Chirurgie générale.	ENJALBERT. FICAT. PASQUIÉ. SOUQUET. SARRAZIN. GAUBERT.
Dermatologie et Syphilographie. .	DUPRÉ.
Hydrologie.	DENARD.
Médecine Légale.	GRÈZES-RUEFF.
Neuro-chirurgie.	ESPAGNO (J.).
Neurologie et psychiatrie.	GAYRAL.
Obstétrique.	ESPAGNO (G.).
Ophtalmologie.	BEC.
Pneumo-phtisiologie.	DELAUBE.

AGRÉGÉS LIBRES

Anatomie.	MM. THOMAS.
Pathologie chirurgicale.	DIEULAFÉ.

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie.	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle.	MM. BOURBON.
Chimie pharmaceutique.	BLANC.
Matière médicale.	VINCENT.
Pharmacie chimique et pharmacodynamie.	CAUJOLLE.
Pharmacie galénique.	STANISLAS.
Zoologie.	ROUX.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie.	M. COUTURIER.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Microbiologie.	MM. BREUILLAUD.
Sciences physiques.	PITET.
Sciences naturelles.	Mme CAUJOLLE.

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Toxicologie.	BROUSSY (G.).

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal.	MM. ROCHE.
Secrétaire.	BERRUT.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891.)

Ce travail est dédié :

A MES PARENTS,

A MA FEMME,

A MA FILLE ET A MON FILS,

A MES BEAUX-PARENTS,

A TOUS LES MIENS,

en gage d'amour et d'affection.

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. VALDIGUIÉ

Professeur de Chimie biologique.

Biologiste des Hôpitaux.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BOURBON

Professeur de Chimie analytique.

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. DOUSTE-BLAZY

Professeur de Chimie biologique.

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BRU

Professeur de Physique médicale.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. BROUSSY

Maître de Conférence Agrégé de Toxicologie.

A NOS MAITRES

DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE TOULOUSE

A NOS AMIS

DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DE TOULOUSE

Avant-Propos

A l'occasion de ce travail, il nous est très agréable d'exprimer nos sentiments de vive reconnaissance aux Maîtres qui nous ont formé et dirigé et qui nous font aujourd'hui l'honneur de présider et de constituer notre Jury de Thèse.

Dès le début de nos études de Pharmacie, M. le Professeur P. Valdiguié a reporté sur nous l'affection qu'il a pour notre Père. Il nous a très paternellement accueilli dans son service et nous lui devons une grande part de notre formation scientifique et morale.

Après avoir suscité en nous la vocation biochimique, il nous a réservé le grand honneur, il y a six ans déjà, de nous déléguer dans les fonctions de Chef de Travaux de Biochimie. Il nous a proposé ce sujet de travail et a suivi quotidiennement son élaboration.

Nous sommes heureux de pouvoir remercier notre Maître de la confiance qu'il nous a toujours témoignée. Nous lui adressons l'assurance de notre profonde gratitude et de notre respectueuse et très reconnaissante affection.

M. le Professeur Douste-Blazy a toujours été pour nous un guide et un conseiller précieux. Son enseignement a largement contribué à notre orientation.

Dès notre monitorat il nous a initié, avec notre Maître commun, aux techniques minutieuses de recherche et nous a fait profiter de son expérience de la Biochimie des Lipides.

Nous avons pu, à maintes reprises, apprécier sa sollicitude à notre égard et la sagesse de ses avis.

Nous le remercions pour la simplicité et l'affabilité avec laquelle il nous a toujours accueilli et nous l'assurons de nos sentiments respectueux et reconnaissants.

M. le Professeur Bourbon nous a appris les bases de l'expertise toxicologique. Nous nous efforcerons de rester fidèle aux principes de Déontologie qu'il nous a enseignés avec conscience et amour de sa profession.

Nous tenons à lui exprimer nos sincères remerciements et notre déférente gratitude.

M. le Professeur Bru nous a montré pendant nos études le rôle des radiations en Biologie. Au cours de ce travail il nous a grandement facilité l'obtention d'isotopes radioactifs. Nous l'assurons de notre vive reconnaissance.

M. le Professeur Broussy nous a toujours manifesté une amicale sympathie. Nous tenons à lui témoigner notre cordial attachement.

Nous n'aurons garde d'oublier nos Maîtres de la Faculté et des Hôpitaux :

M. le Professeur Dardenne, qui a fait preuve d'une grande bienveillance pour nous au cours de notre scolarité.

M. le Professeur Montastruc, qui nous a toujours chaleureusement accueilli et nous a aidé pour notre expérimentation.

M. le Professeur Lareng, qui nous a maintes fois fourni des preuves d'amitié et de cordiale sympathie.

M. le Professeur Pierre Valdiguié, qui n'a cessé d'être un ami très sûr et nous a très souvent conseillé et encouragé dans la réalisation de ce travail.

A tous ceux, Assistants, Chargés de Recherche, Moniteurs et Techniciens qui, dans le Service de Biochimie, nous ont assuré leur collaboration dans l'élaboration de cette Thèse et dans nos fonctions universitaires,

A M. Courrech, dont nous avons utilisé les talents de dessinateur,

A M. Fernand Pons, aide zélé et consciencieux de nos travaux d'expérimentation,

Nous adressons l'assurance de notre reconnaissance et de nos bien vifs remerciements.

Plan

I. — **Travaux antérieurs.**

A. HISTORIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

B. GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

I. Théories.

a) *Chromatographie d'adsorption.*

b) *Chromatographie de partage.*

c) *Chromatographie sur échangeur d'ions.*

II. Appareillage et technique.

a) *Matériel.*

1. Supports.
2. Applicateurs.
3. Cuves.
4. Milieu d'adsorption.
5. Solvants.

b) *Technique.*

1. Préparation des chromatoplaques.
2. Dépôt des substances.
3. Saturation des cuves.
4. Développement.
5. Révélation et identification des composés fractionnés.
6. Elution et dosage.
7. Conservation des résultats.

C. ÉTUDE DES LIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

I. Données acquises par la chromatographie sur colonne.

II. Chromatographie en couche mince des lipides neutres et de leurs produits d'hydrolyse.

III. Chromatographie en couche mince des lipides complexes.

— Phospholipides.

— Glycolipides.

IV. Détection des lipides sur couche mince.

II. — **Recherches personnelles.**

A. TECHNIQUES.

I. Extraction des lipides.

II. Purification des extraits.

III. Chromatographie ascendante en couche mince.

a) *Matériel.*

b) *Préparation des plaques.*

c) *Dépôt des substances.*

d) *Solvants.*

e) *Détection et identification.*

f) *Evaluation semi-quantitative.*

IV. Dosages chimiques.

a) *Cholestérol.*

b) *Esters d'acide gras.*

c) *Phosphore lipidique.*

d) *Bases azotées.*

V. Chromatographie sur papier imprégné a l'acide silicique.

VI. Expérimentation avec du ^{32}P.

B. RÉSULTATS.

I. Lipides sériques.

a) *Lipides neutres.*

b) *Phospholipides.*

c) *Conclusion.*

II. Lipides spléniques.

a) *Lipides neutres.*

b) *Phospholipides.*

III. Lipides du jaune d'œuf.

IV. Expérimentation avec du ^{32}P.

C. CONCLUSIONS.

I. - Travaux antérieurs

A. HISTORIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Un progrès considérable a été réalisé, en chromatographie de partage, par le passage de la technique sur colonne à la technique sur papier (Consden, Gordon et Martin) [37].

Un perfectionnement non moins important a été obtenu en chromatographie d'adsorption par la transformation de la colonne de Tswett en une couche mince adsorbante étalée sur une plaque support.

Les premiers travaux cités datent de 1938 et sont dus à Izmailov et Shraïber [89]. Ces auteurs, étudiant des préparations galéniques sur une couche mince d'oxyde d'alumine, ont bien défini ce nouveau procédé. Le résumé anglais de la publication russe indique l'expression :

« A new method for the chromatographic adsorption analysis is elaboratored, based on the observation of the division of substances into zones on a *thin layer of adsorbant* using one drop of the substance.

« The results obtained by the method proposed are qualitatively the same as those obtained by usual chromatographic adsorption method of analysis.

« The method enables to obtain satisfactory results using one drop of the substance under test, very small quantities of the adsorbant and minimal time.

« The method may be used for the evaluation of galenical preparation and their identification, as well as for a preliminary test of the adsorbant and the kind of the developper. »

En 1947, Williams [237] a employé une couche d'adsorbant déposée entre deux plaques de verre maintenues dans un plan horizontal. La plaque supérieure possède un petit orifice circulaire central servant à l'introduction des échantillons à fractionner puis à celle des solvants de développement. Il s'agit alors de la « chromatographie de surface ».

Meinard et Hall [140, 141] ont ensuite développé la « chromatographie radiale » sur un adsorbant en poudre fixé sur des lames de microscope au moyen d'un liant approprié (amylopectine).

Peu après, Kirchner et Keller [101] ont été les premiers à décrire une technique d'imprégnation du papier par l'acide silicique, utilisant des feuilles épaisses (Whatmann n° 3), immergées dans une solution de silicate de sodium, puis dans de l'acide chlorhydrique 6 N et enfin lavées jusqu'à disparition des traces d'ions chlore. Ces feuilles devaient être activées une heure à 110°C juste avant l'emploi.

Kirchner, Miller et Keller [105] étendirent, en 1951, l'emploi de la chromatographie d'adsorption à des lames de verre de 0,5×5,25 pouces (chromatostrips) ou à des feuilles de papier enduites d'une couche d'adsorbant minéral.

Les agents liants le plus souvent employés sont l'amidon ou le plâtre de Paris. Chaque lame permet l'exécution d'un microchromatogramme ascendant. Pour cela on dépose quelques gammas de la substance à étudier sur l'adsorbant, près de l'une des extrémités de la lame. On plonge cette extrémité dans le solvant d'élution, contenu par exemple dans un tube à essai, et on maintient l'ensemble du dispositif en position verticale. L'ascension capillaire du solvant est très rapide et la durée de la séparation n'excède pas 30 minutes.

Miller et Kirchner [148] ont également mis au point un appareil permettant d'enduire les lames d'adsorbant plus rapidement et d'une manière plus homogène que l'on ne pourrait le réaliser à la main.

Ces mêmes auteurs ont largement employé cette nouvelle technique pour l'étude des terpènes et de leurs produits d'oxydation et pour leur isolement à partir des huiles essentielles [102, 103, 104, 145, 146, 147].

Cette méthode sur chromatostrip fut employée par d'autres chercheurs pour l'analyse des terpènes, notamment par Bryant [30] et Grüner et Coll. [72], pour l'étude des huiles de citrus (Vannier et Stanley) [212, 222] et pour le fractionnement de divers composés organiques (azulènes, peroxydes organiques, coumarines).

Reitsemia [179, 180] étendit et modifia ce procédé en utilisant des plaques de verre de 5×7 pouces (chromatoplaques) pour comparer le comportement des huiles essentielles par chromatographie.

L'emploi de ces plaques, de préférence aux lames, plus étroites, a permis la migration simultanée de substances témoins de part et d'autre des mélanges à analyser. L'adsorbant est obtenu en ajoutant de l'eau à un mélange d'acide silicique 100 mesh et d'amidon. L'ensemble est bien malaxé, porté au voisinage de l'ébullition jusqu'à obtenir l'épaississement maximum de la masse. Une partie aliquote de cette suspension silicique amidonnée est versée au centre de

chaque plaque, et répartie immédiatement sur la surface du verre au moyen d'une spatule. Après un séchage en position horizontale à la température de la pièce, l'activation est réalisée par passage à l'étuve à 105-110°C.

On obtient par ce procédé des couches adsorbantes actives de 0,5 mm d'épaisseur environ.

Rigby et Bethune [182] ont séparé par cette technique les divers constituants des huiles de houblon et Wagner [216] a de même effectué une étude sur les divers phénols.

La détection des colorants alimentaires et celle des acides aminés ont été décrites avec soin par Mottier [153, 154] et Demoie [48] a séparé divers caroténoïdes, différents pigments tétrapyroliques (bilirubine, biliverdine, esters méthyliques des porphyrines) de même que des diterpénoïdes de la classe du phytol.

Rochelmeyer [185] a opéré le fractionnement d'alcaloïdes sur une couche mince d'adsorbant.

Après les résultats intéressants fournis par cette technique séduisante dans l'étude des terpènes, il est étonnant que l'on ne l'ait pas appliquée aux autres lipides.

Stahl [201, 202, 211], entre 1956 et 1959, a mis au point cette méthode en vue de l'exploration des sécrétions végétales et des « races chimiques » chez les plantes pharmaceutiques.

La standardisation du matériel (plaque, cuve et applicateur), l'élaboration d'un adsorbant presque universel : le Silicagel G (Kieselgel G) ont provoqué un essort rapide de ce procédé. La réalisation rationnelle d'une couche adsorbante, strictement inorganique (le liant est ici le plâtre de Paris), mince (250 μ), adhérente et d'épaisseur constante, est ainsi devenue possible. Cet auteur a également préconisé le développement en atmosphère sursaturée, ce qui élimine l'effet marginal, diminue la durée de migration et procure une meilleure reproductibilité aux Rf.

De nombreuses applications ont vu le jour dans tous les domaines analytiques. La technique sur couche mince commence à être employée en biochimie clinique. Elle permet de nombreux examens: vitamines, stéroïdes, acides biliaires, dérivés porphyriniques, amines, amino-acides nucléotides, sucres contenus dans le sérum, l'urine, les selles ou dans les extraits de divers organes.

Plusieurs revues ont été consacrées aux indications et aux développements de la chromatographie sur couche mince, notamment celle de Demole [49, 50], Michaelek [142], Pitra [165], Prochazka [172], Stahl [204, 207, 208], Teijgeler [214], Wollish, Schmall et Hawrylyshyn [239].

B. GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

I. Théories

La méthode sur couche mince peut utiliser les diverses modalités de la chromatographie classique et suivant les diverses substances à séparer peut mettre en jeu des phénomènes d'adsorption de partage, ou même d'échange d'ions.

A. CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION

L'intensité du phénomène d'adsorption est exprimée par la quantité de substance fixée par unité de surface, ce qui peut être représenté par la formule de Freundlich.

L'abaissement de tension superficielle d'une solution dépend de la concentration de cette solution.

$$\Delta\sigma = -K\,c^n \qquad (n < 1)$$

Le signe — exprime que $\Delta\sigma = \sigma - \sigma_0$ est < 0.

On déduit de cette relation :

$$\frac{d\sigma}{dc} = -n\,K\,c^{n-1}$$

En portant cette valeur dans l'équation de Gibbls :

$$a = \frac{K\,n}{R\,T}\,c^n = K'\,c^n$$

on obtient la formule de Freundlich qui relie la quantité adsorbée par unité de surface à la concentration du corps dissous.

1° La substance adsorbée n'est pas dissoute dans la substance adsorbante. Dans ce cas, le phénomène serait régi par la loi de Henry et on aurait $a = K\,c$.

2° La substance adsorbée n'est pas chimiquement combinée à la substance adsorbante. Dans cette éventualité, on aurait :

m = masse de la substance adsorbée,
m' = masse de la substance adsorbante,
S sa surface.

En vertu de la loi des proportions définies, pour une combinaison chimique, on devrait écrire :

$$\frac{m}{m'} = c^{te}$$

Or la la masse m′ est proportionnelle à la surface $m' = KS$ et $a = \frac{m}{S}$ d'où $\frac{a}{K} = C^{te}$.

On peut donc considérer que la formule $a = Kc^n$ représente :

— une dissolution si $n = 1$,
— une combinaison chimique si $n = 0$,
— une adsorption si $n < 1$.

K étant une constante n'ayant pas la même valeur dans chacun des cas. La loi de Freundlich est souvent représentée sous la forme :

$$a = K c^{n'} \qquad \left(n' = \frac{1}{n}\right)$$

qui permet de définir trois degrés d'affinité selon les valeurs de n′ :

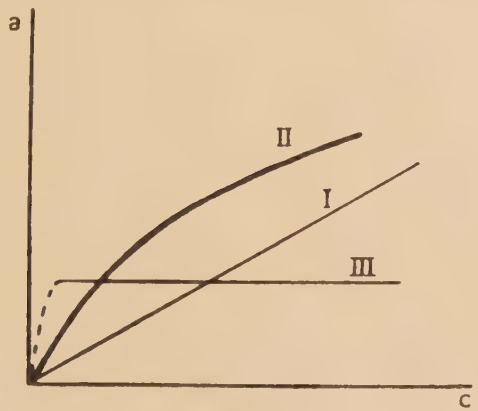


Fig. 1.
Représentation graphique de la formule de Freundlich

I. $n' = 1$ $n = 1$ Dissloution, phénomène purement physique.
II. $n' > 1$ $n < 1$ Adsorption (isotherme de Freundlich), phénomène physique et chimique.
III. $n' = \infty$ $n = 0$ Combinaison, phénomène purement chimique.

L'adsorption apparaît donc comme une sorte d'intermédiaire entre la dissolution et la combinaison. Sa caractéristique essentielle est d'être un phénomène de surface et non de volume.

Comme le prévoit la formule de Gibbs, l'adsorption diminue lorsque la température croît, ceci est un argument en faveur de la conception généralement admise que l'adsorption (comme d'ailleurs la dissolution) est un phénomène physique.

L'adsorption n'est pas un mécanisme unique. n′ peut varier dans des limites larges de 1,5 à 10. En présence d'un adsorbant donné,

la force avec laquelle les différents constituants d'une solution seront adsorbés peut être très inégale. D'où la possibilité de l'adsorption sélective dont on connaît les immenses applications en chromatographie.

De plus, un même adsorbant ne fixe pas la même quantité d'un corps dissous, à la même concentration, dans les solvants différents. L'adsorption est d'autant plus intense que la solubilité est plus faible dans le solvant considéré.

D'où le principe de la séparation chromatographique par adsorption.

Soit un adsorbant sur lequel on dépose une solution d'un corps donné. Si la couche est homogène et si le solvant de développement a un écoulement uniforme, la proportion des deux phases (liquide et solide) est la même. Il y a un équilibre de répartition entre les deux phases.

Une quantité α m reste en solution et le reste $(1 - \alpha)$ m est adsorbé. Le liquide se déplace plus vite que le corps dissous. On peut donc caractériser une substance par son déplacement; celui-ci ne dépend que du coefficient α de répartition entre l'adsorbant et le solvant.

Activation des adsorbants

Le pouvoir adsorbant d'un corps déterminé peut varier dans de grandes limites, selon le traitement qu'on lui fait subir. Suivant le cas on pourra, soit l'activer, soit le désactiver. A part certaines modalités particulières (lavages à l'eau, traitement à l'acide chlorhydrique), l'activation résulte de la diminution de la teneur en eau « libre ». La désactivation procèderait de l'opération inverse, c'est-à-dire de l'augmentation de la quantité d'eau fixée sur les centres actifs. L'eau libre est celle qui peut être fixée ou éliminée reversiblement, par opposition à l'eau liée dont l'élimination est irréversible et entraîne une modification de la structure de l'adsorbant, avec enlèvement des propriétés adsorbantes.

L'alumine, par exemple, ne doit pas être portée au delà de 400°C, son adsorption maximum semblant se situer vers 200°C. La silice semble avoir un maximum d'activité par chauffage à 300°C.

La codification de cette technique a été effectuée par Brockmann et Schodder [25]. Par chauffage on prépare une alumine de haute activité (alumine I), puis par contact plus ou moins prolongé avec une atmosphère humide il se produit une désactivation (alumine II, III, IV, V). Les divers types d'adsorbants sont déterminés par la différence des chromatogrammes obtenus avec des colorants azoïques : azobenzène (1), p méthoxyazobenzène (2), jaune Soudan (3),

rouge Soudan (4), p aminoazobenzène (5) et p hydroxyazobenzène (6). Deux de ces colorants sont dissous dans un mélange d'éther de pétrole et de benzène, le mélange est versé sur une colonne de l'adsorbant et on élue avec une même quantité de solvant.

Dans le tableau suivant les chiffres romains correspondent aux types d'Alumine, les chiffres arabes aux mélanges de colorants. Le premier trait horizontal représente le sommet de la colonne et le trait inférieur sa base. Tout colorant inscrit en dessous du trait inférieur est considéré comme étant passé dans le filtrat (v. tabl. 1).

Tableau 1

Détermination de l'activité de l'alumine selon Brockmann et Schodder [25]

Alum.	I	II		III		IV		V
Color.	1-2	1-2	2-3	2/3	3/4	3/4	4/5	5-6
Colonne	Méthoxyazobenzène Azobenzène	Méthoxyazobenzène	Jaune Soudan Méthoxyazobenzène	Jaune Soudan	Rouge Soudan	Rouge Soudan	Aminoazobenzène Rouge Soudan	Hydroxyazobenzène Aminoazobenzène
Filtrat		Azobenzène		Méthoxyazobenzène	Jaune Soudan	Jaune Soudan		

B. CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

Ce procédé de séparation chromatographique a été pour la première fois exposé dans la publication de Martin et Synge [139] concernant « un nouveau type de chromatogramme utilisant deux phases liquides ».

Cette méthode fait appel aux différences de solubilité des composés à séparer vis-à-vis des deux solvants, d'où leur migration due uniquement à des différences de « coefficient de partage » entre l'eau et une phase solvante mobile. De là vient son appellation de chromatographie de partage.

Une substance poreuse, peu adsorbante et capable de retenir l'eau (gel de silice par exemple) est en contact avec deux phases, l'une mobile, l'autre aqueuse et fixe.

La phase stationnaire est constituée ici par l'humidité de la colonne, du papier ou de la couche mince désactivée.

La phase mobile entraînera donc les substances à une distance du point de départ qui est proportionnelle au coefficient de partage eau/solvant, d'où un fractionnement des composés en rapport avec leur solubilité respective dans chacune des phases.

En réalité, il se superpose à ce processus pur de partage, un certain phénomène d'adsorption dû à l'activité du support qui est loin d'être négligeable. Il devient nécessaire d'ajouter, au système eau/phase apolaire, un solvant miscible aux deux phases de manière à empêcher l'adsorption.

C. CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEUR D'IONS

Les résines échangeuses d'ions n'ont pas encore été utilisées pour l'étude des composés lipidiques. Elles fournissent d'excellents supports pour le fractionnement en couche mince des matières protéiques, principalement des acides nucléiques (Randerath) [173, 174, 175].

II. Appareillage et Technique

A. MATÉRIEL

1° Supports

Dès le début, des plaques de verre, de plus ou moins grand format, ont été utilisées pour fixer la couche adsorbante. Suivant la taille, on divisait même la méthode en technique sur « chromatostrips » (Kirchner, Miller et Keller) [105] ou sur chromatoplaques (Reitsemia) [180].

a) Lames

Les lames ont été principalement utilisées pour séparer des mélanges peu complexes de substances ayant des coefficients d'adsorption assez différents. Izmailov et Shraïber [89] ainsi que Meinhard et Hall [140] ont été les premiers à s'en servir dans leur technique d'analyse radiale. Peifer [164] a même préconisé, à côté des lames de 25×70 mm et des plaques photographiques de 80×100 mm, l'usage de lamelles couvre-objet de 25×30 mm. Cet auteur recouvre ces plaques d'adsorbant en les trempant dans une suspension de silicagel G en milieu chloroformique. Ce mode opératoire a l'avantage de n'exiger l'emploi, ni d'un applicateur, ni de lames d'épaisseur constante et le temps de séchage est bien diminué.

Hofmann [82] a opéré de bonnes séparations de mélanges de glycérides et de divers composés bilaires soit sur des lames de micro-

scope de 26×76 mm (examen d'un seul échantillon), soit sur des plaques de 66×66 mm (contenant jusqu'à 8 échantillons). La couche d'adsorbant est déposée avec un appareil Desaga classique. Wasicki [233] a aussi employé des lames de microscope.

b) Plaques

Depuis la codification de la chromatographie en couche mince par Stahl [201], l'emploi de plaques de verre de 200×200 mm, 200×100 mm, ou 200×50 mm s'est très étendu et presque généralisé. L'épaisseur de ces supports varie entre 3,7 et 5 mm et suivant la construction de l'applicateur, elle peut influer sur la compacité de la couche.

c) Tubes

Un moyen assez séduisant a été préconisé par Lie et Nyc [118] qui ont proposé de recouvrir d'une couche mince d'acide silicique la face interne de tubes à essai qui servent à la fois de supports, de cuve à chromatographie et de container pour la révélation des taches par les vapeurs d'iode.

2° Applicateurs

Depuis la première publication de Miller et Kirchner [148], de nombreux auteurs ont décrit avec détails les appareils leur permettant d'étendre la suspension sur les plaques.

Stahl [203], pour sa part, en a étudié plusieurs types dont deux au moins sont construits à assez grande échelle. Le plus simple (« Desaga-Roucaire ») est constitué par un support en matière plastique de 22×113 cm possédant deux bords de retenue sur lequel on dispose cinq plaques de 200 mm (ou 20 de 50 mm) encadrées par deux plaques liminaires de part et d'autre. L'ensemble est maintenu stationnaire grâce à l'encadrement du support sur deux côtés.

Le dispositif d'étalement est constitué par une cuvette cylindrique en métal inoxydable ouverte selon une génératrice, ce qui permet le remplissage de la suspension d'adsorbant, puis après avoir fait pivoter de 180° le système au moyen d'un levier externe, la mise en contact de la suspension avec les plaques. On fait coulisser alors cet ensemble de la gauche vers la droite d'un mouvement continu et la couche se dépose d'une manière uniforme et homogène sur le jeu de plaques. Après séchage et activation l'épaisseur d'adsorbant est de l'ordre de 250 à 275 μ.

Une variante de cet appareil distributeur, le modèle S, est également proposée. Un réglage de la paroi d'étalement permet l'obtention de couches uniformes de 250 μ à 2 mm, ce qui fait employer ce

dispositif pour les travaux préparatifs lorsqu'on désire employer des plaques de capacité plus importante.

L'appareil de revêtement « Camag - Paris-Labo » réalisé par Mutter et Hofstetter [156] se compose d'un plateau dans lequel est creusé un certain nombre de rainures longitudinales, d'un rail de guidage et d'un réservoir fixe destiné à recevoir la suspension d'adsorbant. Le réservoir est constitué par deux parois latérales fixes et par deux parois transversales mobiles. La paroi mobile antérieure est percée de deux trous certicaux dans lesquels viennent se loger les vis de rappel dont le jeu règle l'épaisseur de la couche.

Le modèle A permet d'enduire une plaque de verre de 100 mm de large ou deux plaques de 50 mm placées côte à côte. Il peut également servir à l'étalement sur des plaques photographiques usagées (90 mm).

Le modèle B est monté pour une largeur de travail de 200 mm, c'est-à-dire pour le revêtement soit d'une plaque de 200×200, soit de deux plaques de 100 mm. Si l'on doit toutefois enduire un certain nombre de plaques de 100 mm ou de 50 mm il vaut mieux ramener la largeur du dispositif à 100 mm en revissant au centre du plateau la paroi latérale fixe opposée au rail de guidage.

La largeur de l'espace entre le bas de la paroi antérieure de l'appareil et la plaque conditionne l'épaisseur d'adsorbant, en règle générale 300 μ. Une jauge permet d'obtenir cette valeur mais le fait de tourner les vis de rappel provoque un déplacement de 500 μ par rotation complète.

120 à 150 ml de suspension semi-fluide sont disposés dans le réservoir et la première plaque est poussée en avant à l'aide de la suivante, d'un mouvement uniforme. Cet appareil présente l'avantage de pouvoir employer des plaques d'épaisseurs différentes (en ayant soin de les placer par ordre décroissant) et aussi de préparer des couches plus épaisses dans le but de travail semi-préparatif ou préparatif.

L'équipement « Shandon » se compose :

— d'un support unoplan n° 2810 destiné à fixer contre deux rails au moyen d'éléments gonflables, une série de 5 plaques de 200×200 mm, 10 plaques de 200×100 ou 20 plaques de 200×50 mm,

— d'un applicateur mobile n° 2818 pouvant couler des couches de 200 à 1 000 μ d'épaisseur (réglable par 100 μ).

Ce procédé présente la particularité de ménager une marge libre d'adsorbant de part et d'autre de la plaque. On peut également employer des plaques d'épaisseur inégale sans affecter l'uniformité et la régularité de la couche d'adsorbant déposée.

Le dispositif « Serva » (Jarre et Jacquin) est constitué par une barre parallélipipédique reposant sur les bords de la plaque, qui, en se déplaçant uniformise la couche d'adsorbant déposée au préalable assez régulièrement sur le verre.

Suivant la face que l'on emploie l'épaisseur est de 0,3, 0,5 ou 1 mm. Le quatrième côté, employé pour des lames plus étroites, produit des couches de 0,30 ou 1 mm sur une largeur de 50 mm.

Il est également possible d'étaler le silicagel avec une baguette de verre calibrée comme le proposent Lees et de Muria [114] où d'enduire les plaques avec un vaporisateur Bekersky [14]. Duncan [53] décrit un nouvel appareil pour obtenir des chromatoplaques. Pour augmenter la capacité, Rosi et Hamilton [186] recouvrent les plaques d'adsorbant sur les deux faces.

3° Cuves

Leur volume doit être en rapport avec la surface du support sur lequel se fera la migration.

— Pour les chromatostrips des tubes à essai de fort diamètre (tubes à glycémie) renversés sur un petit bécher contenant le solvant, conviennent parfaitement.

— Des allonges cylindriques bouchées hermétiquement, constituent d'excellentes enceintes pour les plaques rectangulaires de 200×50 mm.

— Les plaques de 200×200 mm prennent place dans des cuves parallélipipédiques de 4 000 à 4 500 ml de capacité. L'étanchéité est assurée par un couvercle plan possédant des rodages enduits d'une pellicule de graisse aux silicones.

Une réalisation ingénieuse, réalisée par la Firme « Shandon », permet la migration simultanée d'une douzaine de plaques de 200×50 mm dans une chambre de développement de dimensions classiques. Ce dispositif comporte deux galeries latérales crénelées permettant la disposition des plaques rectangulaires perpendiculairement aux deux faces principales de la cuve. Ces décrochements peuvent également permettre l'emploi, avec des chromatoplaques de 200×200 mm, des techniques de chromatographie descendante et même d'appareillage permettant de réaliser des gradients de pouvoir éluant.

4° Milieux d'adsorption

a) Adsorbants

Leur choix est fonction des composés à séparer et ils déterminent la composition des mélanges de développement.

On peut classiquement les diviser selon leur activité :

Activité forte	*Activité moyenne*	*Activité faible*
Bentonite.	Chaux éteinte.	Talc.
Magnésie.	Magnésie.	Inuline.
Charbon activé.	Carbonate Mg.	Amidon.
Alumine activée.	Phosphate Ca.	Saccharose.
Silice activée.	Carbonate Ca.	SO_4Na_2 anhydre.
Silicate Mg activé.	Carbonate Ba.	SO_4Mg.
Terre à foulon.		8-hydroxyquinoléine.

Silicagel.

Le Silicagel (Kieselgel G ou gel de silice) est le plus fréquemment employé. Il a été mis au point par Stahl [201] et est constitué par le mélange de gel de silice à fine granulation (80 à 200 mesh) et d'un liant : le plâtre (SO_4Ca 0,5 H_2O). Ce produit est dénommé « Silicagel G pour chromatographie en couche mince selon Stahl ».

La teneur en plâtre de Paris peut atteindre 15 %. Dans certains cas particuliers, notamment pour l'étude de composés minéraux, il peut être nécessaire, comme l'indique Seher [193], de laver l'adsorbant à l'acide chlorhydrique, puis à l'eau et aux solvants organiques, pour ôter toutes les impuretés métalliques (le fer notamment). On est alors obligé de réajuster la teneur en sulfate de calcium avant de préparer les plaques.

Pour l'obtention d'un milieu extrêmement régulier on pourra tamiser le gel (mailles 0,06 - 0,075 mm). On est ainsi pratiquement assuré d'obtenir des couches à texture très fine et d'apparence très uniforme à la fois en lumière transmise et réfléchie.

On peut obtenir un produit assez semblable en mélangeant intimement du Silicagel Mallinkrodt 200 Mesh avec 10 à 15 % de SO_4Ca, 0,5 H_2O de même granulation.

La suspension est habituellement réalisée en milieu aqueux à raison de deux parties (en volume) d'eau distillée pour une partie (en poids) de Silicagel.

D'autres solvants ont été proposés : Solution d'alcool polyvinylique à 2,5 % (30 ml/23 g), acétone (30 ml/16 g), chloroforme ou mélange chloroforme-méthanol (3-2) (v/v) (100 ml/35 g). Cet emploi de véhicules non aqueux présente l'avantage de diminuer le temps de séchage et de prise de l'adsorbant (qui demande 20 à 30 minutes à température du laboratoire).

Ce procédé permet la préparation de plaques par simple immersion. Il est également utilisé par Lie et Nyc [118] pour enduire d'acide silicique l'intérieur des tubes à essai. Toutefois, cette tech-

nique produit des couches assez peu adhérentes et, pour leur conférer une meilleure tenue, il est souvent nécessaire d'exposer les plaques à la vapeur d'eau.

Deferrari et Coll. [46] préconisent, pour l'étude des dérivés acylés des sucres, la confection d'une suspension d'acide silicique avec 10 % d'amidon portée au bain-marie à 80-85°C jusqu'à épaississement du mélange.

Yamamura et Niwaguchi [241] emploient également l'amidon de pomme de terre comme liant pour leurs plaques d'acide silicique.

L'adsorbant peut aussi être utilisé sans SO_4Ca ni autre liant, sous forme de couche libre, aisément détachable du support de verre. Ceci peut être avantageux surtout en vue d'un travail préparatif en employant des dépôts pulvérulents d'épaisseur plus notable (de 0,5 à 2 mm).

Des procédés d'activation et de standardisation de l'acide silicique ont été décrits et tous les degrés d'activité selon Brockmann [24] peuvent être obtenus d'une manière reproductive (Hernandez et Coll.) [77].

Cependant la surface ne possède pas une énergie uniforme (Klein) [107]. Cette hétérogénéité serait due à la coexistence de divers types de groupements :

— Silanol (— Si(|) — OH) qui prédomine (énergie de surface 129 ± 8 erg/cm²) ;

— Siloxane (— Si(|) — O — Si(|) —) provenant du précédent par déshydratation durant la prise et le séchage (énergie de surface 259 ± 3 erg/cm²) ;

— Silanol hydraté (— Si(|) — OH, H_2O) qui persiste même après séchage important.

En règle générale, si les séparations sont suffisantes, il n'est pas nécessaire de réaliser un degré rigoureux d'activité.

Les couches d'acide silicique possèdent non seulement d'excellentes propriétés mécaniques (dureté) mais aussi une sélectivité remarquable vis-à-vis des composants oxygénés.

Selon Filimonov [58], cette sélectivité peut s'expliquer par un processus d'adsorption comportant l'établissement de liaisons hydrogène entre l'acide silicique et les corps adsorbés.

Les molécules contenant des atomes à doublets électroniques libres (O, N) sont particulièrement touchées par ce mécanisme et plus ou moins retenues selon la polarité et l'empêchement stérique de ces centres actifs (Mac Donald) [120].

Les Rf obtenus sur chromatoplaques sont variables et Stahl [209] préconise la migration simultanée d'un mélange de colorants. L'emplacement des composants de la substance à analyser est exprimé en fonction de celui des spots témoins.

En présence de benzène, chloroforme ou de mélange de même pouvoir éluotrope, on utilise une solution benzénique de jaune de beurre (p-diméthylaminobenzène), rouge Soudan (dihydroxyazobenzène) et indophénol (diméthyl-p-aminophénylnaphtoquinoléine).

D'autres colorants, tels que l'azulène, sont recommandés pour des solvants moins polaires (éther de pétrole, toluène ou tétrachlorure de carbone).

Couches d'acide silicique modifié.

Pour le fractionnement de substances acides, Stahl [205] a proposé l'emploi de plaques d'acide silicique acides. Une solution de 0,5 N d'acide oxalique remplace l'eau pour la préparation de la suspension de Silicagel.

D'autres (Pfeifer) [164] ajoutent 2,5 % de SO_4H_2 concentré à leur liquide, ici un mélange $CHCl_3/CH_3OH$ 3/2 (v/v). De telles plaques présentent en outre l'avantage de contenir leur propre révélation. Le chauffage suffit pour faire apparaître les spots par carbonisation de la matière organique.

Stahl [205] a décrit la préparation de plaques basiques à partir d'une solution de KOH 0,5 N.

Pour obtenir une meilleure séparation de la phosphatidyl-éthanolamine et de la phosphatidylsérine, Skipski, Peterson et Barclay [198] utilisent une suspension de Silicagel dans une solution 0,01 M de carbonate de Na.

Honegger [83] a séparé amines et amino-acides par ionophorèse et chromatographie combinées, sur des couches de silicagel, Kieselgur et oxyde d'aluminium déposées en milieu tampon citrate 0,01 M à pH 3,3.

Mangold et Kammereck [127] ont employé des chromatoplaques de gel de silice contenant 10 % de $SO_4(NH_4)_2$ pour fractionner phospholipides et dérivés fortement acides. Ce mélange durcit très rapidement.

Les couches adsorbantes acides, alcalines ou même salines n'adhèrent pas fortement au support. Il est nécessaire de laisser sécher

plusieurs heures de telles plaques à température de la pièce avant de procéder à leur activation.

Oxyde d'alumine.

L'oxyde d'alumine (Aluminium oxide G) est supérieur à tous les autres adsorbants pour le fractionnement chromatographique des vitamines liposolubles (Davidek et Blattna) [40]), des triterpènes (Huneck) [86]. Il est également employé avec succès pour séparer les 2-4-dinitrophényl-hydrazones des dérivés carbonylés (Rosmus et Zdenek [187] et Anet [6]).

Honegger [83] et Waldi et Coll. [232] utilisent, selon leur solvant, des plaques de Silicagel, alumine ou Kieselgur pour isoler amines, amino-acides et alcaloïdes. L'alumine a été employée sans liant, sous forme de dépôt uniforme (Mistryukov) [149, 150, 151].

L'élution se fait dans ce cas, soit par la technique descendante, soit par la méthode horizontale, ces plaques étant très peu inclinées (angle de 30° par rapport au plan horizontal).

Bien que Trappe [216] ait signalé des phénomènes d'hydrolyse des liaisons esters et d'isomérisation des doubles liaisons pendant la chromatographie des mélanges de lipides complexes, Vacikova et Coll. [218] ont étudié le comportement des fractions lipidiques sur des couches d'alumine.

La suspension se fait avec 50 ml d'eau distillée pour 25 g d'oxyde d'alumine Merck et avec 65 ml pour 20 g d'alumine Fluka. La teneur en SO_4Ca serait pourtant de 5 % dans chacune de ces préparations.

Un degré de haute activité, correspondant au type II de l'échelle de Brockmann, est obtenu par chauffage des chromatoplaques, pendant une durée minimum de 4 heures à 200-220°C. Ces plaques doivent être refroidies puis conservées dans un dessicateur contenant de l'alumine d'activité I.

Si on désire un degré d'activité moins élevé (III ou IV) par exemple, on porte les plaques à une température plus faible (150 à 180°C) pendant une durée identique.

Stahl [209] a décrit une technique adéquate pour déterminer l'activité de l'alumine selon l'échelle Brockmann [24].

Pour l'essai d'activité de cet adsorbant, on utilise un mélange de six colorants :

Azobenzène,
p méthoxy-azobenzène,
Jaune du Pont (Amino-azo-toluène),
Soudan III (Amino-azobenzène azo-β naphtol),
p amino-azo-benzène.
p hydroxy-azo-benzène.

Terre d'infusoire.

La Terre d'infusoires (Terre de Diatomées, Célite ou Kieselguhr G) est également conditionnée avec du plâtre et sa préparation a été codifiée par Stahl [203].

C'est un adsorbant très faible. Les plaques de cette substance permettent la chromatographie de partage de mélanges très hydrophiles ou amphotères. Stahl et Kaltenbach [210] l'utilisent pour le fractionnement chromatographique des sucres. On prépare la suspension à raison de 25 g de poudre pour 50 g d'eau distillée.

Autres adsorbants.

Tous les matériaux adsorbants utilisés pour la chromatographie sur colonne ont été essayés par la technique sur couche mince, soit sous forme de couches libres, soit sous forme de film solide grâce à un liant.

Kirchner, Miller et Keller [105] ont décrit des couches de magnésie, de carbonate de magnésie, d'hydroxyde de chaux, de carbonate de chaux et même de phosphate bicalcique. La séparation des 1- et 2-monoglycérides a été effectuée par Hofmann [82] par chromatographie d'adsorption sur hydroxyapatite.

La cellulose peut également être déposée sur des chromatoplaques et servir de support à la migration de la substance alcaloïdique. Huit grammes de ce produit, homogénéisés avec 50 ml d'eau suffisent pour recouvrir 5 plaques de taille standard (200×200 mm), d'une couche de cellulose. De telles plaques, en employant le procédé décrit par Lea [112], peuvent être utiles pour séparer les lipides de leurs impuretés.

Randerath et Struck [175] ont séparé des fractions d'acide nucléiques sur des plaques de cellulose MN 300 déposées en solution acétonique.

Il est également possible de préparer des chromatoplaques au moyen de :

— Poudre de cellulose Ac (Acétylée à environ 10 %),
— Poudre de cellulose CM (Carboxyméthylées),
— Poudre de cellulose P (phosphorisée),
— Poudre de cellulose F 254 (avec additif fluorescent à 254 mμ).

Ces divers milieux existent sous deux formes, selon qu'ils renferment ou non un agent liant.

b) *Résines échangeuses d'ions*

Randerath [174] a décrit l'emploi de couches d'une résine échangeuse d'ions, dérivée de la cellulose, l'ECTEOLA cellulose qui, éluée

par du ClNa 0,15 M permet le fractionnement des divers acides adénosine - phosphoriques.

Ces composés formant des complexes avec l'ion Ca++, on ne peut utiliser le plâtre comme agent liant. On le remplace par du Collodion.

c) *Phases stationnaires pour chromatographie de partage*

Des couches de Silicagel peuvent être imprégnées de silicone, undécane ou autres paraffines. Elles deviennent alors hydrophobes et permettent des séparations par partage.

Malins et Mangold [123] immergent lentement leurs plaques, à température du laboratoire, dans une solution éthérée contenant 5 % de silicone « Dow Corning ».

Kaufmann et Makus [97] ainsi que Kaufmann, Makus et Diecke [99] préfèrent employer un contact de 2 mn dans une solution de paraffine (5 %) dans l'éther de pétrole. Ces mêmes auteurs pratiquent également une imprégnation par l'undécane, de même que Peereboom et Beekes [163].

Pour ces diverses techniques il importe que les plaques et les solutions de phase stationnaire soient à la même température et que l'opération se fasse lentement.

Ce matériel peut être utilisé sitôt après adsorption du solvant.

Des couches de polyéthylène (« Hostalen « S ») , de perlon (Stahl [207], Birkofer et Coll. [18]), de polyamide (Davidek [39]) ont été employées avec succès pour des séparations assez spécialisées (acides et leurs esters méthyliques, flavonoïdes).

Le tableau suivant résume les particularités et les indications des principaux supports décrits pour la chromatographie en couche mince (Tableau 2).

5° Solvants

Le choix du solvant est fonction de l'adsorbant utilisé et du type de séparation recherché : séparation en classe, ou séparation des individualités biochimiques.

Généralement on préfère utiliser un mélange assez simple (2 à 3 constituants) pour pouvoir mieux contrôler la résolution des substances que l'on étudie. Un système à composants multiples a tendance à produire des fronts de solvant secondaires, provoquant

PROPRIÉTÉS DES PRINCIPAUX SUPPORTS
d'après WALDI [230]
Tableau 2

SUPPORT DE LA MIGRATION	PROPRIÉTÉS			COMPOSÉS FRACTIONNÉS
	RÉACTION	ACTIVITÉ	MÉCANISME SÉPARATEUR	
Silicagel	Acide	Actif	Adsorption Partage (échange)	Pratiquement tout
Oxyde d'alumine	Basique	Actif	Adsorption Partage (échange)	Principalement bases stéroïdes
Kieselgur	Neutre	Inactif	Partage	Sucres Produits pharmaceutiques Triglycérides Acides gras supérieurs
Phosphate de magnésium		Faiblement actif	Adsorption	Caroténoïdes Tocophérol
Trisilicate de magnésie		»	»	
Hydroxyde de calcium	Basique	»	»	
Phosphate de calcium	Faiblement basiq	»	»	
Sulfate de calcium		»	»	Après imprégnation hydrophobe : Acides gras et glycérides
Alusil G (Silicagel G + Oxyde d'alumine G 1/1)	Acide + Basique		Séparation (échange)	Colorants Barbituriques
Limonite hydratée		Actif	Adsorption	Composés polaires
Charbon		Actif	»	Composés apolaires
Cellulose	Neutre (pratiquement)	Nulle	Partage (échange)	Colorants Amin-acides
Polyamide	Neutre			
		Inactif	(échange ?)	Flavones
Nitrile polyacrylique	Neutre	Inactif	Partage (échange ?)	Anthocyanes
Echangeurs	Acide + Basique	Inactif	Echange Partage	Acides nucléiques

des anomalies de séparation (dédoublement des taches).

La solubilité d'un composé est en rapport avec la polarité, la constante diélectrique, la structure moléculaire et le jeu des liaisons hydrogène (Tableau 3).

Très approximativement, les substances riches en groupements hydrophiles se dissolvent dans les solvants polaires.

Les substances contenant surtout des groupements hydrophobes se dissolvent dans les solvants non polaires.

Les groupements fonctionnels :

— Oxhydrile	— OH
— Carboxyle	— C $\lessdot^{O}_{OH}$
— Nitrile	— C ≡ N
— Aldéhydes	— C $\lessdot^{O}_{H}$
— Cétones	= C = O
— Amines	— NH_2
— Amides	— CO — NH_2

sont hydrophiles.

Les groupes hydrophobes sont constitués par les chaînes aliphatiques (CH_3, C_2H_5 et leurs homologues supérieurs).

La solubilité d'un corps, dont la structure comprend plusieurs de ces deux types de groupements, est déterminée par la « balance lipophyle hydrophile », c'est-à-dire par leur rapport mutuel.

Par exemple : l'acide acétique est soluble dans l'eau.

L'acide stéarique est insoluble; ceci est dû à l'élévation du rapport des groupements lipophiles aux groupements hydrophiles dans cet acide gras.

Les solvants organiques, de polarité faible ou nulle, dissolvent les substances riches en groupements hydrophobes : lipides, stérols, terpènes, huiles essentielles, etc.

Les solvants polaires dissolvent les composés possédant une prédominance de groupements hydrophiles : sucres, acides, alcool, nitrites, etc.

Certains solvants (méthanol, éthanol, isopropanol, cellosolve), par mélange avec des quantités variables d'eau, agissent comme des agents tantôt hydrophobes (éthanol absolu, éthanol 95°), tantôt hydrophiles (alcool à bas degrés).

CONSTANTES PHYSIQUES DE QUELQUES SOLVANTS

Tableau 3

	DENSITÉ	SOLUBILITÉ DANS 100 ML D'EAU A 15°C	POLARITÉ MOMENT DIPOLAIRE × 10^{18}	TENSION SUPERFICIELLE	P.E. EN DEGRÉ C	CHALEUR SPÉCIFIQUE (grandes calories par gramme)	CHALEUR LATENTE DE VAPORISATION (grandes calories par kg)
Non ou peu polaires, utilisés pour l'extraction de groupes de principes non ou peu polaires (huiles, essences, stéroïdes) :							
Heptane	0,679	0,005	0	»	98°C	0,507	74
Trichloréthylène	1,455	0,01	»	»	152°C	0,223	»
Hexane	0,655	0,014	0	18,4	69°C	0,527	79,2
Toluène	0,862	0,047	0	28,4	110°C	0,364	86,8
Benzène	0,873	0,073	0	28,9	80°C	0,419	93
Tétrachlorure de carbone	1,58	0,08	0	26,8	76,7°C	0,198	»
Sulfure de carbone	1,26	0,218	»	33	46,2°C	»	84
Doués d'une faible polarité :							
Chloroforme	1,479	0,621	1,05	27,3	61°C	0,232	58
Ether	0,707	7,42	1,14	17	34°C	0,521	88,4
Acétate d'éthyle	0,894	8,4	1,86	24,3	77°C	0,457	88,3
Doués d'une forte polarité, pouvant être modifiée par mélanges :							
Méthylal	0,853	»	»	»	42,3°C	0,521	
Dioxane	1,033	Très sol.	»	»	101,4°C	»	
Acétone	0,788	*Idem*	2,8	23,7	56°C	0,514	125
Alcool méthylique	0,796	*Idem*	1,68	22,6	64,5°C	0,590	267
» éthylique	0,785	*Idem*	1,70	22,2	78°C	0,505	208
» isophopylique	0,780	*Idem*	»	21,7	82°C	»	»
Glycérol	1.257	*Idem*	»	63,4	29°C	0,576	158
Eau	1	*Idem*	1,86	72,7	100°C	»	»

En 1949, Brockmann et Volpers [26] avaient découvert que l'ordre d'élution de molécules organiques d'une colonne d'adsorption était établi par le type et le nombre de leurs groupements fonctionnels.

Les hydrocarbones arrivaient en tête, suivis par les esters, cétones, alcools et acides.

Dans chaque classe, les composés saturés sont élués avant les non saturés. Les corps poly-éthyléniques ayant des doubles liaisons isolées sont plus facilement entraînés que ceux qui contiennent un système de double liaisons conjuguées. Les composés cis- sont plus mobiles que leurs isomères trans-.

Ces mêmes règles s'appliquent en couche chromatographique mince d'adsorption et la séquence n'en est pas modifiée. A l'intérieur de chaque tache même, les composés saturés sont concentrés à la partie frontale du spot.

Trappe [215] a été le premier à établir une classification des solvants en fonction de leur pouvoir d'élution croissant. D'autres séries éluotropes ont été décrites : Lennartz [115], Strain [213], Knight et Groenning [109], Reichstein [177]. Certaines variations à l'intérieur de ces gammes sont dues à la diversité des substances (et des critères) qui ont permis cette classification (Tableau 4).

Ces gammes éluotropes sont d'une grande utilité pour le choix d'un solvant adéquat et pour l'établissement de mélanges aptes à séparer le mieux possible deux substances de coefficient d'adsorption voisin, présentes dans un même extrait.

Les précurseurs de la technique sur couche mince, Izmailov et Shraïber [89] puis, plus récemment Stahl [201] et Peifer [164] ont préconisé une sorte de « chromatographie radiale », sur une goutte d'extrait déposée sur une plaque enduite d'adsorbant, pour déceler le mélange éluant le plus approprié au fractionnement, celui qui produit les cercles concentriques les mieux isolés. Le solvant déterminé par cette méthode, rapide et peu dispendieuse, est ensuite utilisé à une plus grande échelle, sur chromatoplaque, pour une étude plus approfondie de la valeur des Rf ou sur une colonne pour une séparation quantitative.

L'emploi d'un mélange solvant ainsi élaboré est très répandu, en adsorption, pour la résolution de diverses catégories de substances.

Pour la chromatographie de partage sur couche mince, on peut utiliser les phases mobiles déjà employées dans les techniques sur papier imprégné de silicone ou de paraffine. Ce sont en général des solvants polaires, tels le méthanol, l'acide acétique, l'acétonitrile, le chloroforme, l'eau, mélangés en proportions variables suivant les fractionnements à effectuer. Ils doivent être, avant emploi, saturés avec la phase stationnaire, imprégnant la couche de silicagel.

TRAPPE [215]	STRAIN [213]	KNIGHT GROENNINGS [109]	REICHSTEIN [177]
Ether de pétrole	Ether de pétrole : 50- 70°C	Heptane	Ether de pétrole
Cyclohexane	30- 50°C	D. isobutylène	Ether de pétrole + Benzène (1, 2, 5,
	70-100°C	Benzène	10, 30, 50 %)
Tétrachlorure de carbone	Tétrachlorure de carbone	Chlorure d'isopropyle	
Trichloro-éthylène	Cyclohexane	Ether isopropylique	
	Sulfure de carbone	Ether éthylique	Benzène
Toluène	Ether éthylique anhydre	Acétate d'éthyle	Benzène + Ether (1, 2,
Benzène	Acétone anhydre	Butanol sec	5, 10, 30, 50 %)
Dichloro-méthane	Benzène	Ethanol	Chloroforme
	Toluène		
Chloroforme	Esters d'acides organiques	Eau	
		Acétone	Chloroforme + Acétate
Ether éthylique	1-2-dichloro-éthane	Méthanol	d'éthyle
Acétate d'éthyle	Alcools		
	Eau	Acide pyruvique	
Acétone	Pyridine		Chloroforme + Acétate
N. Propanol	Acides organiques		d'éthyle + Métha-
Ethanol	Mélanges d'acides ou bases, eau, alcool ou pyridine		nol
Méthanol			
Eau			
Pyridine			

SÉRIES ÉLUOTROPES

Tableau 4

Les plaques sont généralement traitées par des solutions de paraffine, de silicone, de squalène, d'undécane ou de polyéthylène.

Certaines modalités peuvent être également utiles pour la séparation de paires critiques.

Les acides palmitique et oléique peuvent être individualisés à basse température (4 à 6°C), au moyen d'un mélange : acide acétique-acide formique-eau (2-2-1) sur plaques de Silicagel G imprégnées de silicone.

Sur de mêmes plaques, la résolution de nitriles saturés peut être effectuée avec des solutions oxydantes (par exemple acétonitrile-périhydrol-eau (70-10-20) (MANGOLD) [125]).

Dhopeshwarkar et Mead [51] ont mis au point un gradient continu de pouvoir éluant qui permet la séparation de composés de polarité assez différente sur une même plaque.

Par ce procédé, Rybicka [189] effectue un fractionnement des produits de la glycérolyse de l'huile de lin au moyen d'affusion continue et progressive d'éther dans de l'éther de pétrole. On passe d'une concentration de 10 % en éther éthylique au début de la migration à un taux de 60 % en fin d'opération.

B. TECHNIQUE

1° Préparation des chromatoplaques

La présence de gypse, dont la prise est relativement rapide, limite le temps de préparation à quelques minutes (2 à 4 selon la dilution).

On effectue une suspension homogène de l'adsorbant avec le véhicule de dilution, soit dans un mortier, soit dans une fiole conique à large col. Il importe qu'il n'y ait ni bulles d'air ni particules agglomérées sous forme de grumeaux.

Ce mélange est versé dans l'applicateur et sert à enduire immédiatement les plaques en opérant d'un mouvement lent et uniforme de manière à obtenir une couche très régulière.

Les plaques sont laissées en position horizontale jusqu'à prise complète du liant, ce qui demande, en fonction de la température et du degré hygrométrique de la pièce, entre 20 et 40 minutes.

Ces plaques sont ensuite activées.

Pour le Silicagel, la durée d'activation n'excède pas 1 heure à 100-110°C.

L'activation de l'oxyde d'alumine demande une température plus élevée (220°C pour un degré Brockmann de II par exemple), et un temps de chauffage plus important (de l'ordre de 4 heures).

Le degré d'activation de la plaque est apprécié par application d'un mélange de colorants d'aniline utilisé par le chromatogramme.

Suivant le degré d'activation désiré ces plaques refroidissent puis sont conservées dans des dessicateurs contenant : chlorure de calcium desséché, gel de silice actif ou même alumine, ou dans des armoires de conservation munies de desséchants. Certains de ces dispositifs sont très perfectionnés et permettent l'introduction d'une micro-pipette de manière à pouvoir effectuer le dépôt des substances à analyser en atmosphère pratiquement anhydre.

Des auteurs préconisent plus simplement de conserver les plaques à l'état hydraté et de ne procéder à l'activation qu'au moment de l'emploi.

Dans le cas de chromatographie de partition (acides aminés par exemple) il suffit de laisser sécher les plaques à la température du laboratoire, pendant une nuit, en position horizontale.

Une épaisseur de 250 à 300 μ suffit habituellement pour tous les travaux analytiques, sauf pour la poudre de cellulose avec laquelle on a aavntage à couler des couches de 500 μ.

Pour avoir une délimitation nette des couches, on pourra essuyer les bords (3 à 5 mm) en faisant coulisser la plaque entre le pouce et l'index.

2° Dépôt des substances

Des chevalets en plexiglass de différentes formes, permettent de marquer les plaques et de répérer, au moyen d'un crayon dur ou d'un stylet en matière plastique, l'emplacement des dépôts et celui de la ligne d'arrivée.

Les pistes sur la ligne de départ, distante de 10 à 30 mm du bas de la plaque, sont généralement espacées de 20 mm mais peuvent ne l'être que de 10 mm. Les pistes marginales ne devront pas être placées à moins de 10 mm du bord de la couche. En règle générale, elles sont réservées au mélange test.

Ritter et Meyer [183], dans un but préparatif, déposent une bande étroite de la substance à fractionner sur la ligne de départ. Pour cela ils préconisent l'emploi d'un système applicateur maintenant en position verticale une micro-seringue soumise à une légère pression d'azote et lui permettant de parcourir la ligne de départ d'un mouvement homogène.

L'acétone et le chlorure de méthyle sont employés comme véhicules des stéroïdes ou des colorants à identifier et la plaque est généralement chauffée auparavant de manière à réaliser une évaporation rapide du mélange organique.

3° Saturation des cuves

Pour les plaques de 200×200 mm on utilise des chambres rectangulaires contenant de 70 à 100 ml de solvant.

Si l'enceinte de développement est fermée hermétiquement par son couvercle de verre, les bords de la cuve étant garnis d'une mince couche de graisse aux silicones, la saturation en vapeurs du solvant est effective en demi-heure environ (en chambre climatisée à + 22°C).

L'élimination de l'effet marginal qui accompagne les mélanges de solvants s'obtient en travaillant en atmosphère saturée (chambre sursaturée). Celle-ci est réalisée en recouvrant les faces longitudinales de la cuve de papier filtre (Stahl) [205] ou même de papier Whatmann 3 MM et en les laissant s'imbiber du mélange de solvants.

Dans ces conditions, le développement est encore accéléré (diminution de un tiers environ de la durée). Les Rf sont légèrement inférieurs, mais ils seraient plus reproductibles et semblent insensibles à certaines variations légères à l'intérieur des mélanges éluants (par exemple : chloroforme avec 6 % ou 10 % de méthanol).

Il est nécessaire de réajuster les solvants avec cette technique de sursaturation. Si les composants ont tendance à rester au voisinage de leurs pistes de dépôt, on choisit un solvant placé plus avant dans la gamme éluotrope ou on en augmente la proportion dans le mélange utilisé.

4° Développement des chromatoplaques

La méthode ascendante classique effectuée à température ambiante est employée le plus souvent. Les cuves peuvent recevoir, soit une plaque, soit deux plaques de grandes dimensions, celles-ci étant libres (placées en V) ou placées sur un écarteur spécial en métal inoxydable.

La base inférieure des plaques plonge dans 5 à 7 mm de mélange éluant, quantité suffisante pour assurer une bonne ascension dans les conditions habituelles. La migration est, dans la majorité des cas, limitée à 10 cm, distance convenable pour opérer une bonne séparation. Au delà, il se produit une diffusion des taches et la résolution manque de netteté.

Pour obtenir un front rectiligne, Stahl [203] recommande d'opérer en atmosphère sursaturée et d'enlever l'adsorbant sur les bords de la plaque tout en évitant le contact entre les bords latéraux de la cuve et des plaques.

On peut également effectuer des développements multiples dans la même direction, avec le même solvant ou avec des solvants différents.

Weicker [234], pour fractionner complètement les lipides sériques sur une même plaque, emploie l'action successive et conjuguée de trois mélanges éluants, deux étant employés simultanément dans la même direction, le troisième migrant à rebours après rotation de 180°.

Stahl [203], puis Peereboom [163] ont transposé la technique des « ponts » de Mathias à la chromatographie en couche mince en prélevant une série d'hexagones de substance adsorbante de part et d'autre des pistes de départ, de manière à obliger le solvant à épuiser au maximum le dépôt contenu sur les ponts d'adsorbants.

Sur chromatoplaque il est également possible d'opérer des séparations suivant la méthode bidimensionnelle. L'emploi simultané avec même couple de solvant ne donne pas de meilleure résolution mais il peut indiquer une altération des composants si les taches produites ne se trouvent pas sur la bissectrice de l'angle formé par les axes d'élution.

Ce procédé peut être utile avec des mélanges peu différents, pour individualiser des substances ayant des constantes d'adsorption assez voisines.

Stahl [206], dans un premier temps, effectue une séparation, puis fait agir un réactif chimique et, au moyen d'un second couple de solvant employé dans une direction perpendiculaire, développe les produits nouveaux formés. Tel est le principe de sa technique S.R.S. (Séparation-Réaction-Séparation).

De même, Miller et Kirchner [147] avaient opéré, sur support, des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse et de déshydratation, puis étudié les termes de ces opérations.

Kaufmann et Makus [97] dans un premier sens, par chromatographie d'adsorption, fractionnaient un mélange puis imprégnaient leur plaque avec une phase stationnaire et terminaient leur résolution, par partage, dans la deuxième direction.

Le développement peut également s'effectuer en position horizontale, surtout si l'on emploie des couches libres d'adsorbant en l'absence de tout agent liant (Vacikova, Felt et Malikova) [218].

Un procédé de chromatographie continue a été préconisé par Brenner et Niederwieser [22], qui laissaient s'écouler le solvant en dehors de la plaque une fois la migration terminée. On peut même ainsi collecter les fractions après leur course.

La chromatographie circulaire sur bandes trapézoïdales a également été employée de même que la séparation par ionophorèse combinée à la chromatographie d'adsorption (Honegger) [83].

5° Révélation et identification des composés fractionnés

Deux sortes de moyens de caractérisation sont ici à envisager selon qu'ils altèrent ou n'altèrent pas les diverses fractions, per-

mettant leur étude ou leur dosage ultérieur. Plusieurs réactifs peuvent être successivement mis en œuvre sur une même plaque en ayant soin de commencer par les moins vulnérants. Leur emploi simultané diminue la probabilité d'omettre la détection d'un composant. Toutes les réactions colorées classiques peuvent être utilisées à la seule condition de ne pas nécessiter de lavage, surtout en milieu aqueux. Cependant Gritter et Albers [70] proposent de vaporiser les plaques avec de l'eau. Le fond devient translucide tandis que les spots restent opaques.

En premier lieu, certains pigments, tout comme en chromatographie sur colonne, sont d'emblée décelables en lumière visible ou ultra-violette. Leur migration peut même être suivie pendant le développement.

Pour faire apparaître les taches en lumière ultra-violette, de nombreux auteurs ont proposé l'adjonction à l'adsorbant de produits chimiques fluorescents. Kirchner, Miller et Keller [105], suivant une suggestion émise par Sease [192], incorporaient du silicate de zinc et du sulfure de zinc et de cadmium à leur couche d'acide silicique. Reitsemia [179] ajoutait 0,004 % de Rhodamine 6 G au liquide de préparation de ses plaques. Stahl [208] préférait employer le sel sodique de la fluorescéine. Mangold [125] mélangeait 1 % de « Luminescent Chimical 60 » (Du Pont de Nemours) à la suspension de Silicagel.

L'examen gagne en spécificité si l'on peut l'effectuer avec des radiations ultra-violettes de longueur d'ondes différentes (254 $m\mu$ et 350 $m\mu$) isolées grâce à un filtre adéquat.

Les réactifs de détection sont pulvérisés sur les plaques à une distance de 30 à 40 cm. On utilise un vaporisateur classique en verre, fonctionnant soit avec une poire de caoutchouc, soit avec un compresseur ou un flux de gaz inerte si on opère une série importante de colorations.

Reio [178] a construit un appareil fonctionnant avec une pression minimum de 2 atmosphères et la Firme Shandon a commercialisé un pistolet de laboratoire (Laboratory Spray Gun).

Il importe de répartir l'agent révélateur de la manière la plus homogène possible en effectuant une série de va-et-vient horizontaux, puis verticaux, en débutant par la position inférieure droite pour terminer à la partie supérieure gauche de la chromatoplaque

On a intérêt, en présence de solutions corrosives appliquées sur les plaques chauffées, à opérer sous une hotte aspirante.

La pulvérisation d'un acide minéral concentré, (NO_3H - SO_4H_2) éventuellement additionné de 0,5 % de formol, suivie d'un passage plus ou moins long à l'étuve à 120°C, produit une carbonisation de toute matière organique sans préjuger de la nature des composés séparés; Kirchner, Miller et Keller [105], Mangold et Coll. [128] Morris, Holman et Fontell [152] employant du SO_4H_2 à 50 % peuvent même, en surveillant l'ordre d'apparition et la teinte de leurs spots, déterminer les divers acides gras qu'ils ont fractionnés.

Ertel et Horner [56] préconisent deux réactifs universels; le premier est constitué par du bichromate de potassium dissous dans SO_4H_2 au un tiers; l'autre, dont la préparation expose à des dangers d'explosion, contient du permanganate de potassium en solution sulfurique. Waldi [230] utilise la coloration gris bleue développée par le prégnandiol en présence d'acide phosphorique à 40 %.

Les sels d'antimoine sous forme de chlorure, tri- ou pentavalents, en solution chloroformique ou dans le tétrachlorure de carbone, sont d'excellents révélateurs des stéroïdes (van Dam, de Kleuver et de Heus) [220], et des lipides aliphatiques (Weicker) [234]. Les teintes spécifiques obtenues peuvent être observées à la lumière du jour ou sous rayonnement ultra-violet.

Kaufmann, Makus et Diecke [99] ainsi que Seher [194] ont préconisé l'emploi de solutions alcooliques d'acide phosphomolybdique pour mettre en évidence les antioxydants et les lipides neutres qui apparaissent sous forme de taches bleues sur fond jaune après chauffage à 100°C.

Les réactifs non dénaturants sont très nombreux et leurs modalités de préparation et d'application élargissent encore leurs possibilités.

Des substances fluorescentes, en solution dans l'éthanol à 96°, sont largement employées par de nombreux auteurs. La 2'-7'-dichloro-fluorescéine, surtout utilisée aux U.S.A., donne en lumière ultraviolette des spots verts sur fond rouge (Malins et Mangold) [123]. La Rhodamine B ou 6 G produit une luminescence pourpre sur fond rosé (Wagner, Horhammer, Wolf) [229], (Kaufmann et Coll.) [99].

Les vapeurs d'iode constituent un moyen rapide et peu vulnérant d'identification. Le contraste obtenu entre les taches brunes et le fond blanc ou jaune sale est excellent et permet de bonnes reproductions (Barrett) [12], (Sims et Larose) [195], (Withehouse et Coll.) [236].

Mangold, Lamp et Schlenk [129] préconisent un traitement de la plaque par une solution alcoolique d'α-cyclodextrine suivi par un passage en atmosphère d'iode. Les monoglycérides apparaissent

sous forme de taches blanches, le fond de la plaque étant violet. Le même processus après un traitement préliminaire par une solution de pancréatine pendant 24 heures à 37°C révèle les di- et triglycérides.

On a également utilisé des solutions d'iode dans le méthanol, ainsi que des solutions d'iodoforme.

Pour faire apparaître les antioxydants et les lipides neutres, Habermann, Bandtlow et Krusche [73] ainsi que Jatzkewitz [90] emploient une solution de bleu de bromothymol en milieu légèrement alcalin. Ces composés produisent des taches jaunes sur fond bleu.

Le réactif de Dragendorff (iodo-bismuthate de potassium) sert à la caractérisation des alcaloïdes et des divers composés choliniques, notamment des phospholipides contenant cette base (Schlemmer) [191], (Wagner) [227] et (Wagner et Coll.) [229].

Une vaporisation de ninhydrine, en solution dans le n-butanol saturé d'eau acétique à 10 %, permet la détection des amino-acides ainsi que des amino-phosphatides sous forme de spots rouge pourpre après chauffage à l'étuve à 105°C.

Selon Barbier, Jager, Tobias et Wyss [11] ainsi que Reitsemia [179], les composés aldéhydiques et cétoniques produisent une coloration jaune orangé en présence de solution de 2-4-dinitrophénylhydrazine en solution chlorhydrique.

Les peroxydes sont caractérisés par Stahl [203] au moyen d'un traitement par une solution acétonique de thiocyanate d'ammonium, puis une solution aqueuse de sulfate de fer.

Seher [193] détecte les antioxydants par pulvérisation d'une solution alcoolique de 2-dichloroquinone-chlorimide. Il obtient ainsi diverses couleurs spécifiques de chaque composé, le fond des plaques demeurant blanc.

Un chapitre tout à fait spécial doit être réservé à la détection des composés possédant des atomes radio-actifs. Il suffit, dans ce cas, de maintenir, au contact de la plaque, une surface sensible aux rayonnements pendant un temps suffisant mais généralement assez long (8 à 15 jours).

Il est d'ailleurs ensuite possible d'employer sur cette même plaque un réactif classique, et il est intéressant de comparer l'autoradiogramme avec les agents chimiques de caractérisation (Brown et Johnson) [29].

6° Elution et dosage

Les divers constituants, nettement séparés au moyen d'un éluant approprié, doivent être détectés par un réactif doux, non vulnérant. On emploie le plus souvent l'examen aux radiations ultra-violettes, ou l'exposition aux vapeurs d'iode pour cercler les spots. Il est ensuite assez facile, par simple grattage, de recueillir isolément la poudre correspondante à chaque tache et de procéder à l'élution du composé qu'elle contient. On emploie pour cela un solvant qui ferait migrer cette substance le plus près possible du front.

Pour chaque prélèvement, il convient de recueillir une égale surface d'adsorbant de manière à obtenir un témoin traité dans des conditions identiques.

Haberman, Bandtlow et Krusche [73] ont de cette manière isolé les phospholipides plasmatiques puis, en effectuant un dosage de phosphore évalué leurs proportions relatives.

De même, Skidmore et Entenman [197] ont séparé par chromatographie bidimensionnelle puis dosé les phospholipides hépatiques du rat. Ces auteurs ont complété leurs investigations par l'hydrolyse des fractions obtenues par cette première migration et par l'étude des produits de simplification.

Pour éluer les pigments des chloroplastes, après séparation sur acide salicique imprégné de solution de triglycérides, Egger [54] préconise l'emploi de la diméthyl-formamide qui présente l'intérêt de produire avec ces pigments le même spectre que s'ils étaient en solution dans l'éther.

Ritter et Meyer [183] effectuent des chromatographies préparatives sur des couches de 1 mm d'épaisseur. Ils décrivent un petit aspirateur en verre, qui est très utile pour récupérer les bandes correspondant aux diverses substances. (Le dépôt du mélange à étudier se fait sous forme d'une ligne continue.)

Dans ce même but de détermination des fractions, les couches d'adsorbant libre, exemptes d'agent liant, fournissent de bons résultats et sont plus faciles à manipuler que celles contenant du gypse.

Sur des plaques recouvertes d'alumine, inclinées sur l'horizontale d'un angle de 30°, Vacikova, Felt et Malikova [218] séparent, en employant successivement deux solvants, les principales fractions lipidiques du sérum et effectuent leur dosage.

Les diverses méthodes de dosage sont des microméthodes habituellement employées. Le seul impératif à observer consiste à réaliser un témoin à blanc sur un volume d'adsorbant identique à celui de la prise d'essai du dosage.

7° Conservation des résultats

De nombreux procédés ont été employés pour conserver une image ou un graphique témoin de la résolution des différentes taches. De véritables installations ont été étudiées et réalisées pour faciliter le travail sur couche adsorbante (Arx et Neher) [7].

Un simple calque, la plaque étant examinée par transparence au moyen d'un négatoscope, suffit pour réaliser un bon schéma. Le procédé nécessite des colorations fournissant des spots très nets.

Un appareil à photocopie classique donne un excellent négatif dans un laps de temps très court (Getz et Lawson) [66]. Cependant, Hilton et Hall [79] préfèrent souligner les taches au stylet avant la reproduction. Eisenberg [55] emploie du papier « Diprint » directement posé contre la couche. Une exposition de 10 minutes, en lumière ultra-violette (deux tubes de 15 Watts) produit un excellent contraste.

L'emploi de plans films, en noir et blanc ou en couleur (Seher) [193], (Morris, Holmann et Fontell) [152] donne de bonnes reproductions mais il nécessite l'emploi d'un agrandisseur.

Un appareil photographique ordinaire est très utile pour fixer sur des diapositives en couleur les nuances obtenues avec un même réactif.

Il est également possible, pour les colorations peu labiles, de recouvrir la chromatoplaque d'une lame de verre de mêmes dimensions et de les solidariser avec des bandes adhésives.

Une pulvérisation de paraffine en solution dans le tétrachlorure de carbone, ou dans l'éther, rend les plaques translucides et permet une meilleure reproduction photographique.

Mangold [125] utilise le procédé consistant à immerger les plaques dans une solution diluée de vernis pour étiquettes (Vernis Fischer). La couche adsorbante est maintenue par le vernis et peut être séparée du verre comme un film. Lichtenberger [117] stabilise les chromatoplaques en vaporisant une dispersion de chlorure de vinylidène ou de proponiate de vinyle. Ces substances se polymérisent et forment un film protecteur.

On peut aussi, selon Meinhard et Hall [141], coller cette couche adsorbante sur du papier adhésif qui permet son prélèvement et sa conservation dans un cahier de laboratoire.

La détermination quantitative des substances, effectuée directement sur la chromatoplaque, serait une technique idéale, surtout

si elle ne demandait pas la destruction ou la dénaturation des composés. Bailey [10] a décrit un appareil permettant le dosage de composés fluorescents (Coumestrol) avec un densitomètre.

La détermination photo-densitométrique des fractions lipidiques après action d'acides concentrés a été réalisée par Privett et Blank [168] ainsi que par Privett, Blank et Lundberg [169]. Ces auteurs ont obtenu d'excellents résultats et les surfaces comprises sous les courbes densitométriques sont directement proportionnelles aux taux des divers constituants. Cependant, certaines substances ne donnent pas des taches permettant une même réponse colorimétrique.

Il est donc nécessaire d'effectuer des courbes de témoins et de réaliser des migrations synchrones de mélanges de composition déterminée.

Mangold [125] détermine l'aire des spots sur documents photographiques. Il estime que cette méthode est utile en pratique courante et que la marge d'erreur est de ± 5 %.

C. CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES LIPIDES

I. Données acquises par la chromatographie sur colonne

L'étude des composés lipidiques par la technique sur couche mince a bénéficié des nombreux travaux effectués auparavant pour la chromatographie sur colonne. Les mêmes phénomènes d'adsorption et de partage peuvent être, en effet, reproduits sur les « Colonnes ouvertes » que constituent les chromatoplaques.

Dès 1940, Trappe [216] avait séparé diverses fractions lipidiques du sérum et avait montré l'existence d'un rapport entre la constante diélectrique et le pouvoir d'entraînement des principaux solvants organiques.

Fillerup et Mead [59] obtiennent une bonne résolution de lipides plasmatique (50 mg) sur colonne d'acide silicique avec les couples suivants (Tableau 5) :

Avec ces mêmes solvants organiques employés dans des proportions différentes, Hirsch et Ahrens [80] obtiennent en tête des pigments caroténoïdes, puis les triglycérides, les acides gras libres, le cholestérol et, en fin d'opération les phospholipides qui sont entraînés par le méthanol pur. Ces mêmes auteurs rapportent en outre l'emploi sur leur colonne d'un gradient d'élution continu d'éther de pétrole progressivement enrichi en éther.

Il suffit de collecter des fractions de l'éluat et de déceler leur contenu par la réaction de Liebermann ou par un dosage de phosphore.

L'isolement de la phosphatidylcholine des autres phospholipides de l'œuf a été réalisé par Hanahan, Turner et Jayko [75] par une technique d'adsorption sur alumine au moyen d'une assez grande quantité d'éthanol. Ces auteurs ont ensuite pu étudier, par la même

FRACTION DANS (l'ordre de migration)	COMPOSITION DU MÉLANGE SOLVANT	VOLUME DE L'ÉLUAT (ml)	%
Stérides	Ether de pétrole + 1 % d'éther	20	98,4 - 100
Triglycérides	Ether de Pétrole + 4 % d'éther	20	90 - 100
Cholestérol	Ether de Pétrole + 10 % d'éther	15	99 - 100
Acides gras	Ether de Pétrole + 50 % d'éther	15	97
Phospholipides	Ether + 25 % méthanol	15	100

Tableau 5

Fractionnement lipidique selon Fillerup et Mead [59]

méthode, la lécithine de la levure et l'assymétrie de position des acides gras des lécithines de foie de plusieurs mammifères et d'œuf.

Lea, Rhodes et Stoll [113] purifient l'ovolécithine obtenue sur alumine par un passage sur colonne d'acide silicique, puis élution par le mélange chloroforme-méthanol (2-1 v/v). Un lavage final au méthanol pur extrait une fraction possédant un pouvoir hémolytique analogue à celui des lysolécithines.

Ultérieurement, ces auteurs emploient, pour la séparation des phospholipides des œufs de poule sur acide silicique, les couples chloroforme-méthanol (7-1 v/v) et chloroforme-méthanol-eau (25-75-5) qui éluent sélectivement les lécithines et leurs lyso composés.

Pour le fractionnement sur acide silicique des phospholipides plasmatiques du rat, Newman, Ching-Tong-Lu, Zilversmitt [157] préconisent l'emploi successif des systèmes suivants :

30 ml Chloroforme ——————→ Lipides neutres
50 ml Chloroforme + 20 % méthanol → Lipides sans choline
140 ml Chloroforme + 40 % méthanol → Lécithine
80 ml Chloroforme + 60 % méthanol → Sphingomyéline
50 ml Méthanol ——————→ Lysolécithine

Wren [240], étudiant la chromatographie des lipides sur acide silicique, dresse un tableau représentant l'ordre d'élution des composés les plus fréquemment rencontrés. Les flèches donnent une idée du comportement des fractions qui migrent le plus difficilement (Tableau 6) :

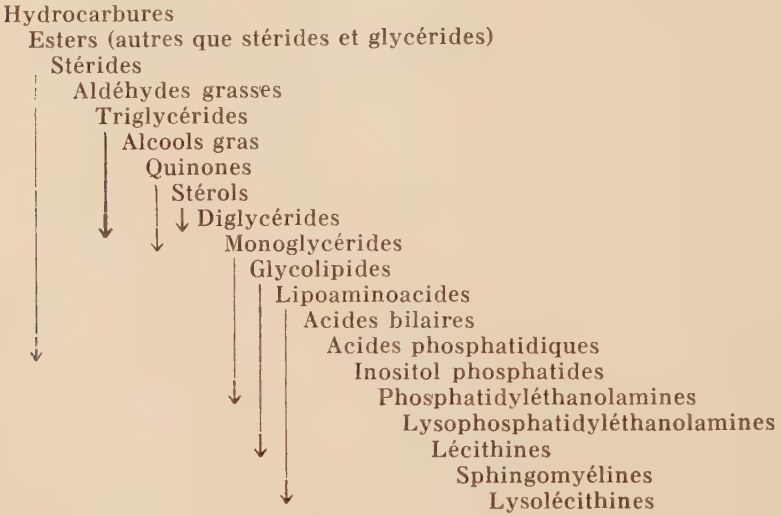


Tableau 6

Ordre d'élution des lipides sur acide silicique d'après Wren [240]

Dans une revue sur les nouvelles sphères d'utilisation de la chromatographie sur couche mince, Stahl [202, 207] propose le schéma suivant permettant de choisir l'activité de la phase stationnaire et la polarité de la phase liquide en fonction de la nature du mélange à fractionner (figure 2).

II. Chromatographie en couche mince des lipides neutres et de leurs produits d'hydrolyse

A. LIPIDES NEUTRES

1° Nature des plaques

La séparation des composés de cette classe s'effectue, dans la majorité des cas, sur des chromatoplaques de Silicagel G. Celui-ci peut être rendu hydrophobe par la paraffine, le tétradécane ($C_{14}H_{30}$)

ou l'undécane ($C_{11}H_{24}$), appliqués en solution à 5 % dans l'éther de pétrole (Kaufmann et Coll.) [98, 97, 96, 94].

Le fractionnement des glycérides a également été tenté par Barrett, Dallas et Padley [13] sur Kieselgel additionné de nitrate d'argent (80 % Silicagel G + 20 % NO_3Ag).

Vogel, Doizaki et Zieve [224] proposent l'emploi de couches adsorbantes d'acide silicique préparé comme suit :

Acide silicique Mallinckrodt 100 mesh..	30 g
Plâtre de Paris.....	0,60 g
Eau.....	59 à 61 ml

L'épaisseur du support est conditionnée par la quantité de solvant.

L'activation est faite 1 heure à 95°C.

La séparation analytique des lipides de *Neurospora Crassa* a été réalisée par Lie et Nyc [118] dans des tubes à essai dont la surface interne est enduite d'une pellicule d'acide silicique d'épaisseur constante évaluée à 0,14 mm.

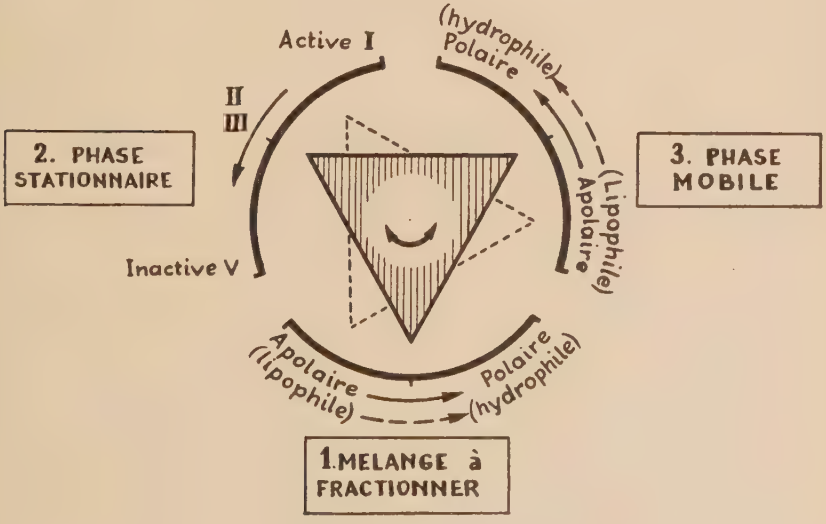


Fig. 2.
Schéma de Stahl [202-207].

L'oxyde d'aluminium qui avait été employé par Akhrem et Coll. [5] pour la séparation des alcools acétyléniques et des glycols a été utilisé à nouveau par Vacikova, Felt et Malikova [218] après traitement par de l'acide chlorhydrique pour atteindre un pH de 4 et activation par la chaleur (degré IV dans l'échelle Brockmann).

Cet adsorbant est déposé sans l'aide de liant, en couche uniforme de 1 à 1,5 mm d'épaisseur; le développement est effectué par méthode presque horizontale (angle d'inclinaison de 30°).

Hofmann [82] a utilisé l'hydroxy-apatite pour le fractionnement des monoglycérides.

Cet adsorbant, d'activité et de capacité plus faibles que le Silicagel, serait utile pour la séparation des lipides polaires. La netteté des spots est affectée par l'adjonction de plâtre, mais elle demeure notablement inférieure, pour les lipides non polaires, à celle obtenue sur gel de silice.

Pour la séparation des triglycérides, Kaufmann et Coll. [93, 95] pratiquent également l'imprégnation de plaques de Kieselghur :

— avec du tétradécane ($C_{14}H_{30}$) en solution à 5 % dans l'éther de pétrole,

— avec de l'huile de silicone,

— avec une fraction de pétrole distillant entre 240 et 250°C.

2° Systèmes solvants

L'éther de pétrole (Eb 60°-70°C) entre dans la composition de nombreux systèmes d'élution.

Il est additionné le plus souvent d'autres solvants organiques, par exemple de benzène (5 % du mélange) pour l'analyse des lipides aliphatiques (Mangold et Kammereck) [127] et la séparation des alcools acétyléniques et des glycols (Akhrem, Kuznecova, Titov et Lenna) [5].

L'éther a été mélangé à l'éther de pétrole (5-95 v/v) pour l'analyse des graisses, huiles et cires sur couches minces de gel de silice G (Mangold et Kammereck) [127], (Mangold et Malins) [130].

Le même mélange a été préconisé par Vacikova et Coll. [218]. Il permet d'obtenir sur alumine deux taches correspondant aux stérides (Rf 0,91) et aux triglycérides (Rf 0,30). La détection réalisée sous lumière ultra-violette (365 $m\mu$) permet de prélever l'adsorbant rendu fluorescent par ces composés. L'élution se fait respectivement par du chloroforme et par le mélange éthanol-éther (1-1 v/v).

Un mélange de composition voisine (éther de pétrole-éther 90-10) est employé par Malins et Mangold [123] pour le fractionnement de lipides complexes ainsi que par Morris, Holmann et Fontell [152] pour la détection et l'évaluation des époxy-acides gras naturels. Ces derniers auteurs sont ainsi parvenus à séparer des isomères très voisins qui n'avaient pas pu être différenciés par chromatographie sur papier.

Mangold et Kammereck [127] rapportent l'identification et le dosage de composés mercuriques d'acides gras après migration dans le couple éther de pétrole-éther (80-20 v/v).

Pour une résolution optimum des mono-, di- et triglycerides, Privett, Blank et Lundberg [169] proposent un mélange constitué de 3 volumes d'éther pour 7 volumes d'éther de pétrole. Les monoglycérides demeurent au point de départ et les triglycérides migrent avec le front du solvant. Les diglycérides fournissent deux spots distincts selon l'emplacement des acides gras (isomères $\alpha\alpha'$ ou $\alpha\beta$). Pour la détermination sélective des monoglycérides, il convient d'employer une quantité d'éther plus importante (90 %), les di- et triglycérides migrant conjointement en tête.

Ces divers couples permettent une évaluation quantitative assez rigoureuse puisque les auteurs peuvent déceler et doser des taux de 0,1 % de tripalmitine dans la monopalmitine.

Des mélanges plus complexes ont été réalisés.

Ils comportent le plus souvent l'addition d'un composé polaire.

Malins [122], pour caractériser les acides gras et les glycérides d'huile de foie de squale sur du gel de silice, ajoute au mélange éther de pétrole-éther (90-10) 1 % d'acide acétique pour prévenir une dénaturation et la formation d'une traînée.

Mangold et Tuna [131] ont pu mener à bien l'étude des lipides tissulaires par chromatographie sur acide silicique avec le couple hexane-éther-acide acétique (90-10-1). Ils identifiaient ainsi la séquence : Hydrocarbures, Stérides, Triglycérides, Acides gras, Stérols, Diglycérides, Monoglycérides et Phospholipides.

Après élution, saponification, estérification, ces composés sont étudiés par chromatographie en phase gazeuse. Des lipides qui n'avaient pas été trouvés auparavant chez l'homme auraient ainsi été détectés dans plusieurs organes humains par ces auteurs.

Vogel, Doizaki et Zieve [224] ont pratiqué le développement avec le couple éther de pétrole-éther-acide acétique (90-10-1). Il permet d'identifier par ordre croissant de Rf, le cholestérol, les acides gras libres, les triglycérides et près du front les stérides.

Un mélange plus polaire (éther de pétrole-éther-acide acétique) (60-40-1) donne un étalement moins important des lipides neutres mais permet un mouvement des monoglycérides hors de l'origine. Il présente cependant l'inconvénient de ne pas séparer les stérides et les triglycérides, qui migrent conjointement en tête.

Dans leur étude des lipides sériques, Vacikovà et Coll. [218] utilisent, après action du couple éther de pétrole-éther, une nouvelle migration par le mélange éther de pétrole-éther-acide acétique dans les proportions 94,5-5-0,5.

Ils obtiennent en tête les acides gras libres (Rf 0,47) suivis par le cholestérol (Rf 0,35). Les phospholipides ne quittent la plage de départ dans aucun des solvants employés. Chacune de ces fractions est extraite de l'adsorbant par le mélange extractif isopropanol heptane SO_4H_2 N (40-10-1), (acides gras), par le chloroforme (cholestérol) ou par l'éther de pétrole (phospholipides).

Le dosage de ces divers composés est effectué par les techniques classiques.

Mangold et Kammereck [127], ainsi que Peifer [164] utilisent un mélange plus polaire, également constitué d'éther de pétrole, d'éther et d'acide acétique unis dans les proportions de 70-30-2 v/v.

Un dispositif permettant l'emploi d'un gradient d'élution est décrit par Rybicka [189] au sujet de la séparation des isomères des mono- et diglycérides.

Au début de l'opération, la cuve contient un mélange de 10 % d'éther, 90 % d'éther de pétrole et 1 % d'acide acétique. Au cours de la migration, une quantité suffisante d'éther est ajoutée, goutte à goutte, pour que la concentration finale en ce solvant atteigne 60 % peu avant que le mélange n'atteigne la limite fixée.

Ce procédé permet d'obtenir des variations de Rf mentionnées dans le tableau suivant (Tableau 7) :

	Ether de Pétrole - Ether (+1 % Acide acétique)		
	6-4	9-1	9-1 ⟶ 4-6
Glycérol + 2 Monoglycéride.	0	0	0
1 Monoglycéride.	0,19	0,06	0,19
1,2 Diglycéride.	0,64	0,17	0,38
1,3 Diglycéride.	0,80	0,17	0,47
Triglycéride.	1	0,63	0,81

Tableau 7

Valeur des Rf obtenus par gradient d'élution (Rybicka) [189].

Kaufmann, Makus et Dieke [99] ajoutent à l'action de l'hexane de la tétraline et du dichloréthane, l'action du mélange chloroforme-acide acétique et éther isopropylique-acide acétique dans les proportions suivantes :

Chloroforme-acide acétique. 24-1
Ether isopropylique-acide acétique. 100-1,5

Ils séparent, dans les migrations à deux dimensions, tous les esters, saturés ou non, compris entre les formiates et les stéarates.

Dans ce but, une première migration est réalisée, sur Silicagel ordinaire par le couple hexane-tétraline 75-25.

Après imprégnation paraffinée une seconde migration est réalisée par le mélange acétate d'éthyle-acétonitrile (7-13).

Pour le fractionnement des triglycérides, ces auteurs [99] proposent l'emploi, sur chromatoplaques de Kieselguhr hydrophobes, les systèmes ci-dessous :

Acétone-acétonitrile.	8-12
Méthanol-acétonitrile-propionitrile. . .	5- 4-1,5
Acétone-acétonitrile.	80-20

Lie et Nyc [118] obtiennent des valeurs assez reproductibles de Rf au cours de leurs migrations en tubes avec les systèmes mentionnés ci-dessous (Tableau 8).

Il convient également de citer un ensemble de techniques plus spécialement adaptées à la séparation des lipides contenus dans le sérum humain.

Weicker [234] étudie conjointement après migration sur le Silicagel, les fractions neutres et phosphorées. Il utilise, dans ce but, la séquence suivante de divers éluants.

Un premier développement est réalisé sur une distance de 4 cm avec le groupe n-propanol-ammoniaque (2-1). A ce moment, la lécithine et le cholestérol ont une même valeur de Rf. Après évaporation de ce mélange, suivant la même direction, une deuxième migration est réalisée grâce au système chloroforme-benzène (3-2) jusqu'à ce que le front atteigne une distance située à 10 cm de la ligne de départ.

Pendant cette seconde opération, les esters du cholestérol migrent en tête, le cholestérol libre atteint une position médiane et la lécithine reste dans le tiers inférieur.

La séparation des stérides est alors possible en employant le tétrachlorure de carbone, à contre-sens, après avoir tourné la chromatoplaque de 180°. Un développement de 4 cm à partir du front précédent sépare les esters de l'acide butyrique, oléique et stéarique en trois spots bien distincts.

Après évaporation des traces de solvants organiques, une pulvérisation de trichlorure d'antimoine en solution acétonique, permet de révéler les diverses fractions obtenues.

Huhnstock et Weicker [85] ont employé cette technique pour le dosage des lipides sériques de 130 sujets sains et de 50 sujets athéromateux.

Tableau 8

	n-HEXANE	ETHER n-HEXANE (3-97)	ETHER n-HEXANE (15-85)	CHLORO-FORME	NH_3 - MeOH CHLORO-FORME (20-80)	NH_3 - MeOH CHLORO-FORME (30-70)
Cholestérol (Oléate)	0,15	0,45	0,87	0,91		
Cholestérol (Palmitate)	0,20	0,47	0,83	0,96		
Stéarate de méthyle	0,17	0,40	0,72	0,99		
Tripalmitine	0,00	0,15	0,62	0,99		
Acide stéarique	0,03	0,13	0,43	0,99		
Acide myristique	0,01	0,10	0,41	0,99		
Cholestérol (Acétate)			0,65	0,63		
β-Sitostérol (Acétate)			0,69	0,55		
Trioléine		0,10	0,57	0,43**	0,95	
Cholestérol				0,28	0,95	
β-Sitostérol				0,26	0,92	
Acide oléique		0,05	0,35	0,26**	0,92	0,95
Ergostérol				0,27	0,86	0,92
Phosphatidyl-éthanolamine				0,00	0,35	0,60
Erythro-sphingosine				0,00	0,34	0,50
Erythro-dihydro-sphingosine				0,00	0,30	0,47
Diplamitoyl-phosphatidylcholine				0,00	0,29	0,48
Sphingomyéline				0,00	0,25	0,42

(**) Ces valeurs, assez paradoxales ont été obtenues, à plusieurs reprises, avec des échantillons justifiés provenant de diverses sources.

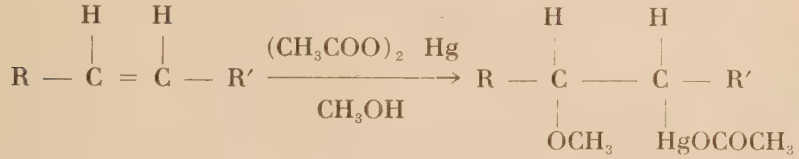
(L'abréviation [NH_3-MeOH] signifie : méthanol-eau-ammoniaque 28 % (93-5-2).

3° Méthodes plus complexes

Il est possible d'étudier, au point de vue structural, des composés lipidiques ayant subi des réactions d'addition ou de simplification moléculaire.

Mangold et Kammereck [126] ont ainsi pu identifier et doser, après séparation sur couche mince, les dérivés acétoxy-mercuriels d'acides gras isomères.

Les lipides non saturés possèdent seuls la propriété de réagir à température ordinaire avec une solution d'acétate mercurique dans le méthanol. On obtient ainsi, avec un rendement quantitatif, des composés méthylés et acétoxymercuriques selon l'équation :



Les composés *cis* réagissent dix fois plus vite que leurs isomères *trans*. Ce traitement permet un fractionnement selon le degré d'insaturation. Il est ensuite possible de régénérer les lipides de leur composition d'addition mercurique en faisant agir du méthanol chlorhydrique.

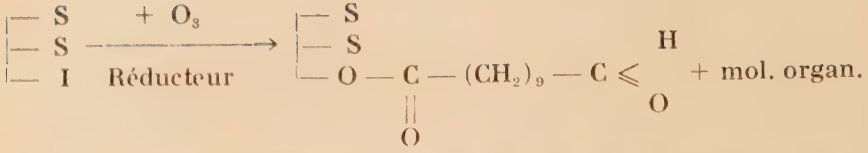
On doit également à Privett et Blank [168] un procédé très séduisant pour fractionner les mono-, di- et triglycérides en fonction du degré de saturation de leur acide gras. Il est basé sur l' « ozonolyse » des acides éthéniques puis la séparation par chromatographie en couche mince et le dosage des restes glycériques. On peut, de la sorte, examiner les 4 types de monoglycérides, 6 types de diglycérides et 5 types de triglycérides.

Pour ces derniers, on peut ainsi, selon Privett et Nickell [170] représenter les six structures possibles :

S = Acide gras saturé.

I = Acide gras insaturé.

L'ozonisation des doubles liaisons puis la réduction catalytique de ces ozonides provoquera, sauf pour le triglycéride (1), entièrement saturé, un raccourcissement de la chaîne et l'apparition d'une fonction aldéhydique sur le résidu glycérique.



Les solvants servant au développement de ces composés aldéhydiques sont :

		v/v
Pour les monoglycérides :	Ether-Skellysolve F	90-10
Pour les diglycérides :	Ether-Skellysolve F	40-60
Pour les triglycérides :	Ether-Skellysolve F	15-85

Emploi de la méthode avec les radio-isotopes

On utilise les mêmes adsorbants et les mêmes solvants pour séparer les composés lipidiques contenant des radio-éléments.

Les réactions de coloration sont remplacées par la détermination de la radio-activité.

La chromatographie en couche mince permet aussi de suivre la marche d'un fractionnement effectué sur colonne, comme l'ont indiqué Dhopeswarkar et Mead [51] lors de l'étude du métabolisme de l'élaïdate de méthyle marqué par du ^{14}C et de l'injection d'acétate de sodium à ^{14}C à des cobayes carencés en graisse.

Après ingestion de l'ester méthylique, ils ont, par exemple, résumé l'incorporation du ^{14}C dans des lipides tissulaires, par le tableau (Tableau 9) :

ÉLUANT DE LA COLONNE	COMPOSÉ IDENTIFIÉ PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE	ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (coups/mg)
Pentane + 2 % éther	Stérides	0,5
	Esters méthyliques	708
Pentane + 5 % éther	Triglycérides	4,1
Pentane + 20 % éther	Stérols	0,4
Méthanol	Phospholipides	3

Tableau 9

Métabolisme de l'élaïdate de méthyle [51]

Privett, Blank et Lundberg [169], puis Brown et Johnson [29] ont employé la technique sur couche mince pour séparer les acides gras radio-actifs de leur mono et tri esters. Dans le travail de ces

derniers auteurs, les composés contenaient à la fois du ^{14}C et du ^{3}H et étaient extraits de la muqueuse intestinale du Hamster. La radioactivité était mesurée, en milieu liquide, après avoir traité l'adsorbant au niveau de chaque spot par 10 ml de mélange naphtalène dioxane. Le rendement quantitatif de cette séparation est assez satisfaisant comme l'indiquent les résultats suivants (Tableau 10) :

RADIOACTIVITE DES FRACTIONS					
COMPOSÉ	RADIO-ACTIVITÉ A L'ORIGINE	MIGRATION DU MÉLANGE		MIGRATION D'UN SEUL COMPOSANT	
	C.P.m.	C.P.m.	%	C.P.m.	%
α-Monoplamitine	1972	2641	95,4	2599	93,9
Acide palmitique	2768	1824	92,5	1826	92,6
Tripalmitine	902	868	96,2	835	92,6

Tableau 10

RADIOACTIVITÉ DES FRACTIONS SÉPARÉES SUR COUCHE MINCE (BROWN ET JOHNSON) [29]

B. STÉROÏDES

L'étude de cette classe de composés a été particulièrement féconde sur chromatoplaques. Les plaques de Silicagel ont été employées par la plupart des auteurs : AKHREM et KUZNECOVA [4], BARBIER et Coll. [11], CERRI et MAFFI [32], SMITH et Coll. [200], BENNET et Coll. [15, 16].

Les couches libres d'oxyde d'alumine ont été utilisées par CERNY, JOSKA, LABIER [31] pour une détermination analytique rapide et dans un but préparatif. La migration s'effectue en position voisine de l'horizontale (angle d'inclinaison 20°), avec des mélanges en diverses proportions d'hexane-benzène-éthanol.

Quelques solvants plus spécifiques ont été préconisés.

Le couple cyclohexane-acétate d'éthyle (85-85 v/v) sert à une séparation rapide (10 minutes) sur gel de silice, de dérivés de la testostérone (CERRI et MAFFI) [32, 33].

La résolution chromatographique des corticoïdes est réalisée par ADAMEK, MATIS et GALVANEK [2] au moyen du système éthanol-chloroforme (5-95 v/v). La sensibilité de la détection serait de l'ordre du μg (γ) par centimètre carré de Silicagel.

AVIGNAN, GOODMAN et STEINBERG [8] ont fractionné des stérols marqués avec ^{3}H grâce au mélange benzène-acétate d'éthyle (5-1 et

20-1 v/v) sur des distances de 20 cm (migration en 60 et 80 minutes) ou dans 40 cm (migration 24 à 36 heures).

D'autres systèmes chromatographiques ont été proposés, notamment par Barbier, Jager, Tobias et Wyss [11], van Dam, de Fleuver et de Heus [220].

Le dépistage des fractions est le plus souvent réalisé par la lumière ultra-violette mais aussi par pulvérisation de trichlorure d'antimoine en solution chloroformique sauf pour les dérivés de la testostérone dont la détection nécessite une solution chlorhydrique de 2-4-dinitrophényl-hydrazine.

Hofmann [81] est parvenu à une résolution excellente et rapide (quelques minutes) des acides biliaires libres, conjugués et de leurs dérivés sur des lames de microscope, avec les mélanges suivants :

Acides biliaires libres :

Acétate d'isoamyle	4
Tétrachlorure de carbone	3
Ether isopropylique	2
Benzène	1
Alcool n propylique	1

Acides biliaires conjugués :

Acétate d'isoamyle	6
Acide propionique	3
Alcool n-propylique	2
Eau	1

Dérivés des acides biliaires :

Cyclohexane	6
Acétate d'éthyle	4

La révélation de ces divers composés est réalisée par pulvérisation de solution alcoolique d'acide phosphomolybdique.

L'étude de l'exérétion des stéroïdes urinaires sur Silicagel au moyen du système chloroforme-acétone (90-10) est décrite par Waldi [231]. La surveillance du cycle œstral et les tests biologiques de la grossesse sont réalisés sur chromatoplaques par cet auteur.

Les substances obtenues sont mises en évidence par une solution de vaniline en milieu sulfurique.

III. Chromatographie en couche mince des lipides complexes

A. PHOSPHOLIPIDES

1° Nature des supports

Elle peut varier avec les nécessités d'isolement de telles ou telles fractions.

Le gel de silice convient dans la majorité des cas.

Habermann et Coll. [73] lui donnent une épaisseur d'environ 1 mm obtenue avec une suspension épaisse de 24 g de poudre dans 40 ml d'eau distillée.

Robinson et Philipps [184] ont aussi employé le Silicagel.

L'acide silicique contenant 2 % de plâtre de Paris, activé ou non, a été préconisé par Vogel et Coll. [224] pour la séparation des phospholipides sériques.

Skipski, Peterson et Barclay [198] emploient pour différencier cérébrosides et phospholipides des plaques de Silicagel neutre activées à 80°C pendant 40 à 60 minutes juste avant la migration.

Des plaques de gel de silice, rendues basiques par une solution 0,01 M de CO_3Na_2, permettent une bonne séparation des céphalines à colamine ou à sérine.

L'absence de plâtre peut être utile pour la séparation des cérébrosides. Cependant Wagner et Coll. [229] ont pu se servir de Silicagel G pour l'étude des sulfolipides et des glycolipides du cerveau de bœuf.

2° Mélanges solvants

Comme pour les lipides neutres, les techniques sur chromatoplaques ont largement utilisé les solvants employés pour les séparations sur colonne. La majorité des auteurs feront appel au mélange chloroforme-méthanol, uni en proportions variables, additionné d'eau ou d'une solution aqueuse à réaction acide ou basique.

a) Solvants neutres

En 1960, Wagner [227, 228], puis Wagner, Horhammer et Wolf [229] ont employé avec succès le système neutre chloroforme-méthanol-eau (65-25-4).

Sur plaque de Silicagel préparée selon la technique classique, ils ont obtenu une bonne résolution de leurs phospholipides et, après coloration appropriée, notaient les Rf mentionnés ci-dessous : la

durée du fractionnement est de 45 minutes pour une course de 10 cm (Tableau 11) :

COMPOSÉ	VALEUR DU Rf	RÉACTIF DE DÉTECTION		
		Ninhydrine	Draggendorff	Molybdate perchlorique
Acides aminés	0 0,10	+	—	—
Lysolécithine	0,21 ± 0,037	—	+	+
Sphingomyéline	0,29 ± 0,055	—	+	+
Lécithine	0,39 ± 0,055	—	+	+
Céphaline à colamine	0,57 ± 0,075	+	—	+
Cérébroside	0,78 ± 0,075	—	—	+
Cardiolipide	0,92 ± 0,015	—	—	+

Tableau 11 — VALEUR DES Rf DES PHOSPHOLIPIDES AVEC LE SYSTÈME DE WAGNER [228]

HABERMANN, BANDTLOW et KRUSCHE [73] ont appliqué cette méthode au dosage des phospholipides plasmatiques. On peut, à première vue, avoir une évaluation qualitative et, après élution des spots et dosage du phosphore, obtenir une détermination quantitative assez valable pour une prise d'essai de 1 ml de plasma.

La migration est réalisée sur une distance d'environ 20 cm.

Le tableau suivant résume les résultats obtenus (Tableau 12) :

L'étude de la substance blanche du cortex cérébral, chez des sujets atteints de sclérose multiple, a été effectuée par HONEGGER [84] avec le mélange chloroforme-méthanol-eau (65-25-4). Cet auteur note une diminution du nombre des fractions (28 à 32 par rapport aux sujets sains : 39).

L'emploi de ce même solvant a permis récemment à CLÉMENT et DI COSTANZO [36, 52] d'opérer la séparation chromatographique et l'identification des phospholipides de la muqueuse intestinale du rat à jeun et en période d'adsorption.

Ils ont pu révéler la présence des phosphatides suivants rangés dans l'ordre de leur séparation, du front à l'origine :

Acides phosphatidiques,
Céphalines à éthanolamine et à sérine,
Lécithines,
Plasmalogènes à choline,
Glycéryl phosphatidyl inositols,
Sphingomyélines,
Lysocéphalines,
Lysolécithines,

chaque fraction a été évaluée par son poids et sa teneur en phosphore.

Tableau 12

DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES PLASMATIQUES (HABERMANN, BANDTLOW ET KRUSCHE) [73].

VALEUR DU Rf	PHOSPHORE		RÉACTIF				
	γ	%	Bleu de Bromothymol	Ninhydrine	Fuchsine-Acide sulfure	Hydroxamate	Fraction
1,0	< 0,2	< 1	Bleu vert	0	0	+	Stéride Triglycéride
0,92	< 0,2	< 1	Bleu vert	0	0	0	Cholestérol
0,85	< 0,2	< 1	Bleu vert	0	0	0*	Diglycéride
0,65	< 0,2	< 1	Vert clair faiblement +	0	0	0	Acide gras
0,46	0,95	4,3	Bleu vert	+	+	0*	Céphaline
0,24	14,25	63	Bleu vert	0	0	+	Lécithine
0,19	2,07	9,2	Bleu vert	0	0	0	Sphingo-myéline
0,16	1,75	7,9	Bleu vert	0	0	0	
0,11	3,18	14,3	Vert clair faiblement +	0	0	+	Lysolécithine
0	0,28	1,2	Trace bleue	+	0	0	Fraction non lipidique

(0*) Du fait de la très faible concentration.

Une étude quantitative sur couche mince, des phospholipides sériques vient également d'être publiée par Robinson et Phillips [184]. Ces auteurs emploient le Silicagel comme phase stationnaire et le mélange de Wagner [227] comme éluant. La détection est réalisée au moyen d'acide sulfurique 18 N et chauffage, ce qui permet un début de minéralisation du phosphore en vue de sa détermination par le molybdate d'ammonium. Ils donnent les taux suivants qui sont en accord avec les déterminations déjà notées par chromatographie sur papier imprégné ou sur colonne d'acide silicique (Tableau 13) :

SUJET	LYSOLÉCITHINE	SHINGOMYÉLINE	LÉCITHINE	PHOSPHATIDYLÉTHANOLAMINE
	µg Phosphore/ml sérum			
Admis pour examen:				
Pas à jeun				
Moyenne (14 sujets)	7,6	12,4	42,8	2,86
Ecart standard	0,91	0,86	3,5	0,049
A jeun	6,0 à 8,80	4,80 à 10,08	24 à 38,08	2,00 à 4,24
Sain :				
Pas à jeun	8,6	16,4	54,8	3,1
Moyenne (8 sujets)	1,93	2,02	3,42	0,40

Tableau 13

Dosage des phospholipides sériques [184].

Le système chloroforme-méthanol-eau, mélangé dans les proportions de 75-22-3 et 65-30-5, a également été utilisé par Schlemmer [190] pour l'étude des phosphatides.

Pour la séparation des lipides phosphorés du sérum, sur acide silicique contenant 2 % de plâtre de Paris, Vogel, Doizaki et Zieve [224] préconisent deux modalités techniques. Sur des plaques activées par chauffage (à 95°C pendant 2 heures) en cuve sursaturée, la migration est réalisée par le mélange chloroforme-méthanol-eau (80-25-3). Sur des plaques non activées, les proportions de ces mêmes solvants doivent être respectivement 80-20-1.

Un autre mélange de ces solvants (16-6-1) permet à Müldner, Wherrett et Cumings [155] de fractionner les lipides cérébraux. L'ordre des différents composés est quelque peu modifié puisque l'on obtient à partir de l'origine : Phosphatidyl-sérines, Lysophosphatidyl-cholines, Sphingomyélines, Lysophosphatidyléthanolamines, Phosphatidyl-cholines, Sulfatides, Phosphatidyl-éthanolamines, Cérébrosides, Acides gras libres et Lipides neutres.

Ce même mélange vient d'être utilisé par Davison et Graham-Wolfaard [45] pour l'analyse quantitative des lipides cérébraux du rat, après injection de ^{32}P.

b) Solvants basiques

Avec un système basique (chloroforme-méthanol-solution d'ammoniaque à 35 %, 14-6-1), Müldner signale la même succession de spots, mais note la présence de ganglioside sur la ligne de départ.

Skidmore et Entenman [197] ont séparé par technique bidimensionnelle les phospholipides hépatiques du rat, puis caractérisé leurs constituants après hydrolyse alcaline.

Le premier solvant est constitué par le mélange chloroforme-méthanol-ammoniaque (60-30-5) alors que pour le second les quantités deviennent (35-60-5). Ce procédé permet de séparer sept phosphatides hépatiques qui ne seraient séparés ni par l'un ni par l'autre de ces mélanges de solvants employés seuls (Tableau 14) :

COMPOSÉS	SOLVANT I	SOLVANT II
Acides phosphatiques	0,73	0,71
Phosphatidyl-sérines	0,19	0,44
Phosphatidyl-éthanolamines	0,58	0,61
Phosphatidyl-inositols	0,31	0,58
Phosphatidyl-cholines	0,35	0,24
Sphingomyélines	0,19	0,20
Lysophosphatidyl-cholines	0,11	0,13

Tableau 14

Rf des phosphatides hépatiques
(Skidmore et Entenman) [197]

c) Solvants acides

Mangold [125] propose l'usage d'un solvant acide, le méthanol contenant 5 % d'acide sulfurique 0,1 N. La migration se fait sur une couche de gel de silice contenant 10 % de sulfate d'ammonium. Le chloroforme mélangé à ce solvant modifié (dans la proportion 80-20) convient parfaitement à la résolution des phospholipides biologiques.

Skipski, Peterson et Barclay [198] se sont spécialement occupés d'obtenir une bonne séparation de divers composés. Pour mieux différencier les cérébrosides des phospholipides, ils opèrent sur des plaques de Silicagel neutres, activées 40 à 60 minutes à 80°C juste avant la migration, avec le système chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (65-25-8-4 v/v).

Des plaques basiques (gel de silice préparé avec une solution 0,01 M de carbonate de sodium) servent à une meilleure résolution de la phosphatidyl-éthanolamine et de la phosphatidyl-sérine.

Le développement est réalisé grâce à un mélange voisin du précédent dans lequel la quantité de chloroforme est ramenée à 50 v.

Les cérébrosides (cérasine et phrénosine) migrent avec le front du solvant sur les plaques basiques mais donnent un spot distinct sur les plaques neutres.

Ces mêmes auteurs [198] viennent de signaler les avantages présentés par des couches libres de gel de silice ne contenant pas de plâtre de Paris.

Les plaques neutres sont développées par le système employé précédemment (50-25-8-4).

Pour les chromatoplaques basiques, deux types de concentration sont employés.

Le mélange chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (50-25-7-3) donne un bon fractionnement sauf pour la lysophosphatidyl-éthanolamine qui donne une tache très voisine de la lécithine. Pour mieux séparer les deux composés on préfère diminuer la polarité du solvant en employant les proportions (50-25-6-2). Dans ce dernier système, il est à noter que la phosphatidyl-sérine et les inositol-phosphatides tendent à donner un seul spot.

Le progrès de la déacylation peuvent être suivis par chromatographie en couche mince. Brockerhoff [23] a, par exemple, pu suivre la décomposition des phospholipides au cours de l'hydrolyse ménagée, en milieu alcalin. Ils ont employé pour cela la technique mise au point par Vogel, Doizaki et Zieve [224].

B. SULFOLIPIDES ET GLYCOLIPIDES

La présence d'une tache due aux sulfatides est signalée par Müldner, Wherrett et Cumings [155] au cours de la séparation des lipides cérébraux par le système chloroforme-éthanol-eau (16-6-1). Ce composé migrerait avec un Rf situé entre celui de la phosphatidyl-choline et celui de la phosphatidyl-éthanolamine.

Pour la séparation des glycolipides, on note, comme pour celle des lipides phosphorés, l'emploi de deux types de mélanges de chloroforme-méthanol suivant que la réaction est neutre ou alcaline.

a) Solvants neutres

Pour l'identification des lipides cérébraux de bœuf, Wagner [227] puis Wagner, Horhammer et Wolf [229] préconisent l'emploi de plaques de Silicagel G et d'un couple chloroforme-méthanol-eau (60-35-8).

Ils obtiennent un fractionnement valable, comme l'indique le tableau ci-dessous (Tableau 15) :

COMPOSÉ	VALEUR DU Rf
Cérébroside libre.	0,70 - 0,80
Ester sulfate de cérébroside.	0,50 - 0,54
Sphingomyéline.	0,46
Ganglioside a.	0,25
Ganglioside b.	0,30

Tableau 15

FRACTIONNEMENT DES LIPIDES CÉRÉBRAUX DE BŒUF (WAGNER ET COLL.) [229]

La révélation est réalisée par le réactif de Dragendorff qui permet de caractériser la sphingomyéline, puis par le réactif à la diphénylamine.

En réalité, ces auteurs obtiennent, pour leurs gangliosides, cinq spots, mais seuls ceux correspondant aux fractions a et b sont assez distincts.

Un solvant neutre, à base de méthanol-chloroforme a également permis à KOCHETKOV, ZHUKUVA et GLUKHODED [110] l'étude sur couche mince des cérébrosides A, B et D provenant de cerveaux de chats. Ils auraient isolé cinq substances dans le groupe A.

KLENK et GIELEN [108] se sont adressé au système n-butanol-pyridine-eau (3-2-1) pour séparer les quatre gangliosides extraits du cerveau humain. Leur migration durait de 2 h 30 à 3 heures et la détection mettait en jeu le réactif de Bial.

L'étude de la structure développée des gangliosides a pu être menée à bien par KUHN, WIEGANDT et EGGE [111] grâce au mélange n-propanol-eau (7-3). A partir de cerveau de bœuf frais, quatre fractions (G_I, G_{II}, G_{III}, G_{IV}) ont pu être isolées et même cristallisées.

b) Solvants basiques

JATZKEWITZ [91] a proposé une nouvelle méthode pour la microdétermination des sphingolipides.

En collaboration avec MEHL [92] il s'est attaché au fractionnement sur couche mince des lipides du cerveau et de leurs produits de conversion ou de décomposition. Il a obtenu de bonnes résolutions en faisant agir, successivement, les trois systèmes :

	v/v
n propanol-ammoniaque 12 %	4-1
Chlorure d'éthyle-méthanol.	49-1
Chloroforme-acide acétique 96 %	95-5

Pour l'isolement des cérébrosides humains, bovins et ovins, Dain, Weicker, Schmidt et Thannhauser [38] décrivent une étude comparative réalisée à l'aide des mélanges :

	v/v
n propanol-ammoniaque-eau	6-2-1
Butanol-pyridine-eau	3-2-1,5

Solution aqueuse de phénol à 76 %.

Ces auteurs proposent l'emploi de solvants à réaction peu alcaline ou même légèrement acide. Il est, en effet, possible qu'un contact prolongé avec un système ammoniacal puisse produire quelque dégradation des composés gangliosidiques.

Müldner, Wherrett et Cumings [155] proposent l'usage d'un milieu de développement constitué de chloroforme-méthanol-solution aqueuse d'ammoniaque 10 % (60-35-8).

Ils ont ainsi comparé le fractionnement de gangliosides contenus dans les extraits de cortex, de substance blanche de sujet sain et de cortex biopsié dans une maladie de Tay-Sach's.

Ils en déduisent une augmentation qualitative du taux des gangliosides, de la sphingomyéline et des sulfatides, augmentation qui se produit également au cours de la maladie de Nieman-Pick et dans la leucodystrophie métachromatique.

Le comportement chromatographique des cérébrosides de la maladie de Tay-Sach's a été également comparé par Gatt et Berman [65] à deux fractions (H G S - 1 et H G-S - 2) isolées de stromas d'érythrocytes humains, contenant de la sphingosine, des acides gras et 1 ou 2 molécules d'hexose dans les éluants suivants (Tableau 16) :

La séparation des isomères de la sphingosine a été réalisée par Sambasivaro et Mac Cluer [190] avec le mélange chloroforme-méthanol-ammoniaque 2 N (40-10-1).

IV. Détection des lipides sur couche mince

Cette étude ne saurait être complète sans l'énumération des réactifs qui ont servi à la détection des diverses fractions.

Le tableau suivant résume les principaux d'entre eux (Mangold) [125] (Tableau 17) :

Les vapeurs d'iode sont très souvent utilisées comme agent de détection car elles n'altèrent pas les composés sur lesquels elles réagissent.

Barrett [12] les emploie pour révéler les fractions azotées ou les stéroïdes après fractionnement sur papier ou sur couche mince d'adsorbant.

Withehouse, Bresler et Staple [236] proposent le tableau suivant qui montre la différence d'affinité des individualités lipidiques envers ce réactif (Tableau 18)

Sims et Larose [195] les décrivent comme un réactif général pour la chromatographie en couche mince des lipides.

	SOLVANT		
	Chloroforme-Méthanol-Eau 60-35-8	n Propanol-Solution ammoniacale à 17 % 70-30	n Propanol-Solution ammoniacale à 12,5 % 80-20
Cytoside.	0,77	—	—
Glycolipide à hexosamine.	0,6	0,3	0,085
Phrénosine.	0,85	0,65	0,4
Fraction H G S 1. . . . . Sphingosine Acide gras 2 molécules hexose	0,78	0,42	0,24
Fraction H G S 2. . . . . Sphingosine Acide gras 3 molécules hexose	0,6	0,3	0,06

Tableau 16

Fractionnement des cérébrosides de la maladie de Tay-Sach's (Gatt et Berman) [65]

RÉACTIF	COLORATIONS	FRACTION IDENTIFIÉE	SENSIBILITÉ (en μg)
Lumière ultra-violette	Diverses Fond blanc	Colorées Fluorescentes	0,1 - 10
Radio-isotope	Auto-radiogramme	Substance marquée	< 0,1
Vapeurs d'iode	Brunes	Lipides insaturés	
Solution d'iode à 1 % dans le méthanol	Fond jaune	Lipides azotés saturés	< 1
α cyclodextrine +	Blanc	Lipides à	
Vapeurs d'iode	Fond pourpre	une chaîne	5
2′7′ Dichloro-fluorescéine	Vert Fond rouge aux u.v.	Lipides neutres saturés ou non	1 - 5
Rhodamine B	Pourpre Fond rosé	Majorité des lipides	1
Bleu de bromothymol	Jaune	Majorité des	
Milieu alcalin	Fond bleu	lipides	0,1 - 1
Fluorescéine +	Jaune	Composés	
Vapeurs de brome	Fond rouge (surtout aux u.v.)	non saturés	1
Hydroxylamine +	Rouge	Esters	5 - 10
Perchlorure de fer	Fond blanc		
Trichlorure d'antimoine. Pentachlorure d'antimoine. Chlorure stannique	Teintes variées Lumière du jour u.v.	Lipides Stéroïdes	1 - 10
Acide phosphomolybdique	Bleu. Fond blanc. Jaune. 110°C	Lipides antioxydants	< 0,5 1
Acide sulfurique 50 %	Brun ou noir	Composé organi-	
Mélange sulfochromique	à chaud	que non volatil	< 1
Ninhydrine	Rouge violacé 105°C	Amino-phosphatides	10
Réactif de Dragendorff	Orangé Rouge orangé	Phospholipides à choline	10 - 20
Diphénylamine acide	Bleue Fond gris	Glycolipides	4 - 10
2-4-Dinitrophényl-hydrazine	Jaune ou orangé	Aldéhydes et cétones	1 - 5
Thiocyanate d'ammonium + Sulfate ferreux	Rouge brun	Peroxydes	
Diphénylcarbazone	Rouge et bleu	Composés d'addition avec l'acétate mercurique des lipides insaturés	10 - 20

Tableau 17

PRINCIPAUX AGENTS DE DÉTECTION DES LIPIDES

(MANGOLD) [125]

	TAUX EN μG		
	50	100	200
Trioléine	++	+++	+++
Tristéarine	±	±	+
Monomyristine	—	±	±
Phrénosine	+	+	++
Sphingomyéline	++	+++	+++
Phosphatidylcholine	++	+++	+++
Phosphatidyl-éthanolamine	+	+++	+++
Lipositol	+	+	++
Acide cholique	+	+	+
Acide désoxycholique*	+	+	+
Acide lithocholique	+	+	+
Trihydroxycoprostane	+	+	+
Cholestérol	++	++	++
Lanostérol	+	+	+
Ergostérol	+++	+++	+++
β-Sitostérol	+	++	++
Progestérone	+++	+++	+++
Testostérone	+++	+++	+++
Œstradiol	+	+	+
Androstènedione	+	+	+
Cortisone	+	+	+
Hydrocortisone	++	++	++
Corticostérone	+	++	++
Désoxycorticostérone	++	++	++
Kryptogénine	++	++	++
Diosgénine	++	++	++
Acide pimarique	+	++	++
Acide abiétique	++	++	++
β-Carotène	+	++	++
Lycopène	±	+	+
Squalène	+	+	+
Vitamine A	+++	+++	+++

(*) L'acide désoxycholique demande un contact plus prolongé dans les vapeurs d'iode avant que la réaction soit notable.

Tableau 18

RÉACTIVITÉ DES LIPIDES AVEC LES VAPEURS D'IODE

(EXPOSITION 24 HEURES)

SUR PAPIER WHATMANN N° 1 (WITHEHOUSE, BRESLER, STAPLE) [236]

II. - Recherches personnelles

A. TECHNIQUES

Les diverses méthodes d'étude des composés lipidiques sont conditionnées par leur structure biochimique.

Le caractère dominant de cette classe est l'insolubilité dans l'eau et la solubilité globale dans les solvants organiques. Bien que cette dernière propriété n'ait pas une égale valeur pour les différentes fractions.

Au sein même du groupe des lipides neutres, on note des différences de solubilité des divers composants. Les stérides et les triglycérides sont plus solubles dans l'hexane que n'y sont le cholestérol et les monoglycérides.

La solubilisation préférentielle des céphalines demande un solvant moins polaire que celle des dérivés choliniques qui nécessitent l'utilisation de solvants à constante diélectrique élevée.

Les techniques physiques de fractionnement des diverses individualités lipidiques sont d'ailleurs fondées sur cette diversité de solubilité dans les solvants polaires ou apolaires.

I. Extraction des lipides

Certains solvants apolaires, tel l'éther, excellent agent de solubilisation des lipides, ne peuvent extraire ces substances du sérum ou des organes sans un traitement préalable.

Il faut donc employer des agents chimiques plus vulnérants qui sont capables de rompre les cenapses lipido-protéiques de Machebeuf [121]. Certains solvants organiques, comme les alcools méthylique et éthylique, dénaturent la fraction protéique et la précipitent. Il y a dissociation des complexes que forment les cénapses et un début de solubilisation du reste lipidique. Ces agents polaires n'étant pas d'excellents solvants globaux il faut, pour avoir une extraction plus complète, faire agir des solvants plus spécifiques de tous les groupes lipidiques tels que l'éther éthylique ou le chloroforme.

La quasi-totalité des méthodes de préparation des extraits lipidiques totaux préconise l'utilisation de ces couples éthanol-éther ou chloroforme-méthanol employés, soit à la température ambiante, soit à chaud. Cette dernière modalité semble devoir être proscrite

si l'on désire effectuer ultérieurement un fractionnement, notamment pour les phospholipides qui présentent une grande fragilité à la chaleur et une extrême sensibilité aux agents d'oxydation ou d'hydrolyse. Pour diminuer le temps d'évaporation, surtout pour les portions éthérées riches en lipides et pour minimiser les risques d'oxydation, nous utilisons un évaporateur rotatif.

A. EXTRACTION DES LIPIDES DU SÉRUM ET DE LA RATE

Nous avons employé indifféremment ces deux types de techniques pour l'extraction des lipides sériques et spléniques.

Le sang est prélevé sans anticoagulant, la séparation du sérum et des hématies réalisée dans les meilleurs délais.

Les rates d'origine humaines provenaient de splénectomie et étaient transportées au laboratoire en caissons réfrigérés. Au cours de l'expérimentation sur l'animal le prélèvement était effectué *post mortem,* après section de la carotide ou décapitation, chez le rat anesthésié. Une dissection assez sommaire permettait de ne retenir que le parenchyme splénique.

1° Méthode de Bloor [19, 20] modifiée par Hewitt [78]

Après précipitatoin des protéines par l'éthanol, le précipité est extrait, à plusieurs reprises, par trituration, avec des solutions alcooliques de titre croissant en éther.

Nous opérons directement dans un pot à centrifugation. Le sérum est versé goutte à goutte dans 10 fois son volume d'alcool absolu, sous agitation continue. Les rates sont dilacérées au moyen de l'Ultra-Turrax dans 10 volumes de ce même solvant. Ce premier temps de suspension et de contact semble essentiel pour la rupture des cénapses et pour augmenter la surface d'action des solvants. Les deux phases sont ensuite séparées par centrifugation (à 5 000 t./mn pendant 10 minutes).

Le précipité est ensuite repris successivement par des mélanges alcool-éther (2 volumes-1 volume) puis (1 volume-2 volumes) et enfin à trois reprises par de l'éther seul. Après chaque adjonction de solvant, nous laissons en contact, à la température du laboratoire pendant 30 minutes.

Les fractions éthéro-alcooliques sont, dès leur séparation, évaporées sous vide à faible température (37°C) au moyen d'un appareil rotatif.

Le résidu jaunâtre est épuisé à plusieurs reprises par un mélange de chloroforme-méthanol (2-1). Nous avons utilisé ce système de

préférence à l'éther de pétrole qui ne solubiliserait pas sélectivement la totalité des lipides et entraînerait des composés non lipidiques (Folch et Coll.) [61, 63].

Ce couple de solvants nous permet en outre de passer directement à la phase suivante de purification, soit par la méthode Folch, soit par passage sur colonne de poudre de cellulose.

2° Méthode de Folch et Coll. [62]

Son auteur l'avait utilisée pour l'étude des lipides de la substance cérébrale.

Nous avons pu l'employer en dissociant le sérum et la pulpe splénique dans 20 volumes de mélange chloroforme-méthanol (2-1).

Nous n'avons cependant pas porté cette suspension au bain-marie, jusqu'à un début d'ébullition des solvants, de peur de dénaturer nos composés. Ce procédé donnait, pour les tissus spléniques, des extraits contenant une forte proportion de composés hémoglobiniques. Il était souvent nécessaire, même après purification par l'eau, de procéder à une filtration sur verre fritté (G_4). Les extraits obtenus étaient limpides mais la teneur en lipides totaux était notablement abaissée.

Nous nous sommes de préférence inspirés du protocole opératoire proposé par Reed et Marinetti [176]. La rupture des cenapses sériques ou spléniques est opérée dans 10 volumes de méthanol, et on maintient une agitation constante dans ce solvant pendant 15 mn.

Vingt volumes de chloroforme sont alors ajoutés à cette suspension et ce mélange est laissé en contact pendant 30 mn. Après centrifugation et prélèvement du liquide surnageant, le précipité est à nouveau traité comme précédemment pendant 30 mn par le couple chloroforme-méthanol (2 p-1 p).

Après cette deuxième extraction, nous avons pratiquement délipidé notre matériel de départ.

L'extrait lipidique ainsi préparé est peu coloré et débarrassé des composés protidiques, surtout de nature hémoglobinique.

Après évaporation sous vide et reprise sélective par le couple chloroforme-méthanol, il a même été possible, surtout pour le sérum, de ne pas effectuer de purification ultérieure de nos lipides.

B. EXTRACTION DES LIPIDES DU JAUNE D'ŒUF

Les phospholipides contenus dans ce substrat ont été obtenus par une méthode déjà employée par Valdiguié, Douste-Blazy, Mathis et Henry [219] pour la préparation des ovolécithines.

Les jaunes d'œufs sont additionnés d'acétone qui, tout en précipitant les protéines, élimine l'eau et les lipides non phosphorés. Le précipité est épuisé par de l'alcool absolu. Après évaporation de ce solvant, on reprend le résidu par de l'éther de pétrole. Cette solution éthérée traitée par un grand volume d'acétone à 4°C, puis à — 10°C, laisse précipiter les phospholipides.

Technique

Deux jaunes, séparés au maximum du blanc, sont traités dans un pot à centrifuger, par deux volumes d'acétone anhydre et maintenus en contact pendant 3 heures à 4°C en agitant soigneusement de temps à autre.

Après centrifugation à grande vitesse pendant 15 mn et décantation du surnageant, le culot est repris par deux volumes d'alcool absolu. L'épuisement est poursuivi pendant 3 heures à la température du laboratoire.

Cette dernière opération est effectuée à deux reprises. Les liqueurs alcooliques rassemblées sont évaporées à basse température sous pression réduite. Le résidu est repris par 50 ml d'éther de pétrole et, après 15 mn, on ajoute 150 ml d'acétone. La précipitation est opérée pendant 30 mn à 4°C, puis pendant 1 heure à — 10°C.

Ce dernier temps opératoire est répété deux fois, puis les phospholipides sont repris par le mélange chloroforme-méthanol en vue de leur purification ou de leur analyse.

II. Purification des extraits

Les solvants employés dans les techniques d'extraction entraînent également des composés non lipidiques, principalement des protéines dégradées, des amino-acides, des hydrates de carbone et des ions minéraux (notamment phosphorés). Pour éliminer le maximum de ces impuretés nous avons employé, soit la méthode de purification selon Folch [62], soit le passage de l'extrait sur colonne de poudre de cellulose, suivie par une élution avec un solvant spécifique.

A. PURIFICATION SELON Folch ET Coll. [62]

Dans cette technique, qui constitue une sorte de dialyse sans membrane hémiperméable, les extraits sont placés au contact d'une quantité importante d'eau. Le méthanol de la phase lipidique diffuse lentement dans la phase supérieure aqueuse et entraîne avec lui la majorité des substances contaminantes.

Une fiole cylindrique haute est remplie aux deux tiers par l'extrait lipidique dissout dans 30 à 50 ml de mélange chloroforme-méthanol (2-1). Avec précaution, on remplit complètement le vase d'eau en ayant soin d'éviter toute émulsion. On immerge ensuite ce vase dans un bécher de 2 litres et on laisse en contact, à 4 C, pendant 12 à 24 heures.

Il s'établit un équilibre entre les deux phases et on note alors une diminution de volume de la liqueur lipidique. Cette diminution est d'un peu moins de un tiers du volume initial.

La phase à prédominance chloroformique, collectée à la partie inférieure, est généralement limpide. Elle contient la majorité des lipides. A l'interface de séparation avec la couche aqueuse, on observe la formation d'un disque blanchâtre, de 3 à 5 mm d'épaisseur, d'aspect floconneux, le « fluff », qui est dû à une condensation de fractions lipidiques émulsionnées. On retire la fiole du bécher et on enlève, au moyen d'une pipette à aspiration capillaire de Van Slyke et Rieben, le maximum de phase supérieure, sans pour cela prélever le dépôt floconneux.

On rétablit, avec du méthanol, le volume de départ. Cette addition permet de reprendre l'émulsion blanchâtre et fournit un extrait purifié « aussi limpide que du cristal ».

Folch et Coll. [62] notent cependant, avec ces modalités, une perte concomittante de l'ordre de 3 % pour les lipides de la substance blanche du cerveau et de 6 % pour ceux du cortex.

Nous avons effectué une vérification qualitative de ce passage de lipides dans l'eau de la phase supérieure. Les réactions au noir Soudan et à l'acide phosphomolybdique étaient positives, le résidu, repris par 2 ml de sérum physiologique, a provoqué l'hémolyse rapide d'une goutte de suspension d'hématies de mouton lavées fraîches. Nous pensons pouvoir dire que cette perte de lipides par lavage affecte surtout la fraction hémolytique, soluble dans l'eau et les solvants très polaires, que constituent les lysophosphatides, spécialement les lysolécithines.

Pour cette raison, nous avons limité l'emploi de cette méthode de purification aux extraits possédant une quantité importante de lipides, surtout riches en phospholipides choliniques et hémolytiques.

Des variantes ont été proposées :

Folch, Lees, Sloane-Stanley [62] mélangent leur extrait avec 20 % du mélange chloroforme-méthanol-eau (3-48-17) dans lequel on peut ajouter différents sels minéraux :

Cl_2Ca.	0,02 %
Cl_2Mg.	0,017 %
ClNa.	0,29 % ou ClK 0,37 %

Ils obtiennent ainsi un système à deux phases sans aucun disque opalescent à l'interface. La phase supérieure contient les impuretés et des quantités négligeables de lipides.

Cette modification ne nous a pas donné les résultats comptés. Après évaporation de la phase inférieure nous avons obtenu un résidu savonneux, sans doute dû au passage de sels minéraux dans la liqueur lipidique.

Pour isoler et identifier la lysolécithine présente dans le sérum humain normal, Gjone, Berry et Turner [67] opèrent leur purification de la manière suivante : Le mélange chloroforme-méthanol (2-1) ayant servi à l'extraction est placé dans une ampoule à décantation. Un égal volume d'eau distillée est déposé lentement, sans émulsionner, sur cette phase lipidique et le système est abandonné jusqu'à équilibration, ce qui demande 3 heures environ. La phase inférieure, ainsi que l'interphase opalescente sont recueillies et évaporées à 37°C sous pression réduite.

Il est ainsi possible d'écarter complètement la phase supérieure de lavage.

Nous avons employé ce procédé pour purifier les extraits obtenus à partir de faibles prises d'essai de matériel biologique.

B. EMPLOI DE LA POUDRE DE CELLULOSE

Biezenski [17] décrit une méthode chromatographique simple pour enlever les impuretés non lipidiques de ses extraits.

Les lipides sont déposés en bande continue, sur du papier imprégné à l'acide silicique, puis élués, par technique descendante, dans un récipient avec un mélange : méthanol-chloroforme (20-80), le rendement est de 100 % mais on ne peut purifier, par feuille, qu'une quantité de lipides correspondant à 1 g de tissu.

Les amino-acides et les ions phosphate minéraux restent dans le papier.

A la suite de Rhodes et Lea [181], nous avons débarrassé notre liqueur des peptides et des amino-acides par passage sur cellulose.

L'extrait lipidique, sous un volume assez restreint (5 à 10 ml), est versé sur une colonne de poudre de cellulose Durieux (20×1 cm) qui a été conditionnée au méthanol et au chloroforme.

L'élution est ensuite pratiquée par un volume important (150 à 200 ml) de mélange chloroforme-méthanol (2-1).

III. Chromatographie ascendante en couche mince

La majorité des auteurs réalisent leurs séparations chromatographiques par la méthode dite d'ascension capillaire, nécessitant l'usage de supports liés par du gypse.

C'est à cette technique que nous nous sommes adressés pour nos fractionnements.

A. MATÉRIEL

Primitivement, nous avons eu à notre disposition un ensemble complet « Desaga » n° 600 composé de :

- un applicateur;
- un support en matière plastique, permettant de maintenir les plaques sur un plan strictement horizontal. Cet accessoire était laissé à demeure sur une paillasse en lave de manière à ne pas modifier sa planéité;
- un applicateur métallique mobile, déposant uniformément une couche d'adsorbant de 250 μ. Cette pièce doit être lavée immédiatement après usage. Il importe de la manipuler soigneusement, de ne pas la rayer, ni de lui faire subir des chocs;
- de plaques de grandes dimensions (200×200 mm) d'épaisseur rigoureusement calibrées (3,9 mm dans le cas présent);
- de plaques rectangulaires (50×300 mm) de même épaisseur servant de plaque de garde ou permettant le dépôt de 2 à 3 pistes;
- un gabarit en matière plastique pouvant être placé en pont sur les chromatoplaques. Ce dispositif, gradué en centimètres, facilite le repérage des pistes de départ et de la ligne d'arrivée, et le dépôt des substances. Il permet, en outre, après coloration, de calculer les Rf;
- des chambres de séparation angulaires (volume : 3 litres) avec couvercle à poignée soigneusement rodé;
- de micropipettes classiques de 10 μl
- un panier pouvant contenir 10 plaques, très utile pour le stockage ou l'activation.

Il nous a également été possible d'utiliser un appareillage « Camag » constitué par :

- un plateau métallique sur lequel est fixé un réservoir dont la paroi mobile antérieure permet de régler l'épaisseur de

la couche adsorbante (au moyen de 2 vis de rappel). Un rebord métallique guide les plaques;

— des plaques de verre de 200×200×5 mm qui passent dans l'appareil et sont enduites d'une couche de milieu d'adsorption;

— des cuves parallélipipédiques (volume : 4 litres), fermées par une plaque de verre;

— un chevalet en plexiglass, dans lequel on glisse les plaques servant aux opérations de dépôt de substances;

— des plateaux perforés s'emboîtant les uns dans les autres, utilisés pour la conservation des chromatoplaques ou pour leur activation;

— des micropipettes à remplissage automatique de 1, 2, 5 μl, surtout pratiques pour une répartition de séries d'un même échantillon en vue de chromatographie préparative.

Cet appareil permet de faire varier l'épaisseur du support déposé sur la plaque. Il nécessite cependant la présence d'un aide et une certaine habitude pour synchroniser les mouvements et opérer le dépôt d'une manière uniforme.

Nous avons également vu fonctionner un ensemble « Serva ». La suspension est d'abord déposée en quantité suffisante sur la plaque. Une barre quadrangulaire, en matière plastique, prenant appui sur les plaques, permet d'uniformiser la couche avec une épaisseur déterminée (300 μ), (500 ou 1 000 μ), en entraînant l'excès d'adsorbant. Ce dispositif est très simple, ne nécessite aucun réglage et ainsi assure une assez bonne reproductibilité. Il est rapproché, par son principe, de celui décrit par Lees et de Muria [114] qui étalent leur masse de gel de silice avec une baguette de verre calibrée.

B. PRÉPARATION DES PLAQUES

Pour obtenir une bonne reproductibilité dans les séparations, il est capital d'employer des chromatoplaques excessivement propres. Le mélange sulfochromique, employé à froid, n'a pas suffi à dégraisser suffisamment notre matériel. Nous nous sommes adressés à la soude alcoolique qui, après un temps de contact de 12 heures, a donné de meilleurs résultats. Il a cependant été nécessaire, pour éliminer les traces de soude, d'opérer un lavage à l'acide chlorhydrique dilué, puis un rinçage très important à l'eau courante. Pour plus de sécurité, avant d'appliquer la couche mince adsorbante, nous effectuons un dernier rinçage à l'éther.

Ce mode de préparation nous a permis d'obtenir une répartition homogène sur toute la surface des plaques. Celles-ci sont alors dépo-

sées sur le support; on évite qu'elles ne se déplacent les unes par rapport aux autres en mettant une goutte d'eau entre la plaque et le support. On vérifie, par une manœuvre de l'applicateur vide, la bonne planéité de l'ensemble. Les différences d'épaisseur produiraient des chocs aux arêtes qui seraient préjudiciables à un étalement correct.

L'adsorbant utilisé le plus fréquemment est le Silicagel pour chromatographie en couche mince selon Stahl [203], « Merck » (Darmstadt). La préparation de la masse à étaler s'effectue comme suit :

30 g de gel de silice G sont mis dans un mortier en porcelaine de 10 cm de diamètre environ. En agitant lentement, on ajoute d'abord 40 ml d'eau distillée et on malaxe en une masse homogène, exempte de bulles d'air et de grumeaux.

Ensuite seulement, on délaie lentement avec 20 autres ml d'eau distillée. Donc 60 ml d'eau distillée seront nécessaires en tout. La durée totale de l'agitation ne devrait pas dépasser une minute à une minute et demie.

La suspension fluide est alors versée dans l'appareil et coulée en couche mince. Il n'a pas été nécessaire de tamiser auparavant le Silicagel, les couches ainsi préparées ayant donné des séparations suffisamment nettes.

Le temps de prise du gypse, qui sert de liant, est d'environ 4 mn. Les opérations depuis la première addition d'eau jusqu'à la fin de l'étalement doivent être terminées dans ce laps de temps.

A la suite de quelques imperfections nous avons abandonné ce procédé et nous avons employé un mode opératoire plus rapide qui a donné entière satisfaction.

Notre prise de Silicagel est introduite dans une fiole conique de 150 ml parfaitement sèche. La quantité d'eau nécessaire est versée en une seule fois, en prenant soin de laver les parois. L'homogénéisation est effectuée par un mouvement de rotation, puis par un mouvement de va-et-vient jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Ce temps demande de 15 à 20 secondes uniquement. Le contenu est versé dans l'applicateur, et après 15 secondes de repos, la masse aqueuse est étalée sur les chromatoplaques.

Ce dernier procédé ne demande donc qu'une minute environ depuis l'addition d'eau et la fluidité du milieu permet de réaliser des couches très régulières.

Les plaques sont ensuite abandonnées à l'air libre, jusqu'à évaporation de l'eau et prise de l'adsorbant.

Au début, selon les indications de Stahl [203] nous avons effectué aussitôt l'activation de l'ensemble des plaques. Elles étaient glissées, la couche vers le haut, dans les glissières du châssis de

séchage. L'ensemble était porté à l'étuve à 105°C et, là, incliné de manière à obtenir une circulation d'air adéquate et à empêcher l'eau de condensation d'endommager la surface enduite.

Après 30 minutes, le processus de séchage et d'activation est terminé.

Le matériel est placé dans un dessicateur de 30 cm de diamètre, rempli de gel « cyanilique », pour le refroidissement des plaques. Les couches doivent ensuite être conservées à l'abri des vapeurs du laboratoire et de l'humidité de l'air.

A la suite de Skipski, Peterson, Barclay [198] nous avons préféré stocker les plaques sans leur faire subir le passage à l'étuve. Le séchage et l'activation étaient réalisés isolément pour chaque chromatoplaque, juste avant leur emploi, à 105°C pendant 30 mn.

Les couches examinées, tant en lumière incidente qu'en lumière transmise, doivent présenter un aspect régulier. La surface doit être lisse et dépourvue de granulations. La couche doit adhérer fortement et ne pas se détacher lors d'un léger essuyage avec le doigt.

En technique ascendante, seule une portion de la plaque est utilisée. On peut donc employer des plaques présentant des inégalités assez localisées.

Pour éviter l'effet du bord, on a avantage à enlever l'adsorbant des portions latérales sur 5 à 10 mm en saisissant la plaque entre le pouce et l'index.

Nous avons également utilisé des plaques d'Alusil. La suspension était obtenue en mélangeant 20 g de Silicagel G à 20 g d'alumine avec 80 ml d'eau distillée, le séchage à température ordinaire de ces plaques demandait plusieurs heures et n'améliorait pas nos résolutions.

Le fait d'enrichir le Silicagel en acide silicique (8 g + 22 g) ne nous a pas donné de meilleurs résultats.

Pour employer avec succès les solvants à base de diisobutylcétone, utilisés sur papier imprégné, nous avons essayé de réaliser sur plaques des supports appropriés.

Un mélange intime de 10 g de poudre de cellulose « Camag » et de 5 g d'acide silicique mis en suspension dans 65 ml d'eau, a permis d'enduire de façon régulière les chromatoplaques. Après séchage, la durée d'activation de celles-ci était réduite à 15 minutes à l'étuve à 110°C.

Lie et Nyc [118] ont fractionné des lipides de *Neurospora crassa* dans des tubes enduits d'un revêtement d'acide silicique.

Ayant eu quelques difficultés à réaliser une couche homogène d'acide silicique à l'intérieur du tube à essai, nous avons employé un

mélange de Silicagel et d'acide silicique (4 g + 6 g) en suspension dans 25 ml de chloroforme.

Des tubes ainsi préparés ont été utilisés pour établir le pouvoir de séparation de nos systèmes chromatographiques.

C. DÉPOT DES SUBSTANCES

Les pistes de départ se trouvent sur une ligne située à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque et sont distantes de 2 cm.

Nous avons obtenu nos meilleurs résultats pour un dépôt de 400 à 600 μg de lipides totaux, en solution dans 10 μl de mélange chloroforme-méthanol (2-1 v/v). Ce volume est déposé μl par μl, en ayant soin de ne pas altérer l'adsorbant, de manière à obtenir un cercle de diffusion de diamètre inférieur à 5 mm. Il est important de ne pas prolonger outre mesure ce temps de répartition des échantillons car la couche adsorbante subirait une désactivation qui nuirait à un fractionnement reproductible.

Il nous a été possible pour identifier plus sûrement nos individualités, d'employer des témoins purs ou des mélanges de phosphatides employés en biologie et en sérologie. Pour les lipides neutres nous avons utilisé des témoins de palmitate de cholestérol, de trioléine, d'acide oléique et de cholestérol libre.

Pour les lipides phosphorés nous avons employé des témoins de lysolécithine et de lécithine extraits du jaune d'œuf, des solutions de céphaline-cholestérol (réactif de Hanger) ainsi que de l'antigène cardio-lipidique de Kline.

D. SOLVANTS

Comme de nombreux auteurs, nous avons essayé d'adapter nos mélanges pour les employer dans des enceintes sursaturées. Cette modalité, obtenue en tapissant au moins trois faces avec du papier Watmann 3 MM, présente l'avantage de diminuer le temps de migration et de fournir des résultats plus reproductibles. Cependant, ce procédé réduit la valeur des Rf.

Nous avons également, dans un but de standardisation des fractionnements, employé des plaques activées immédiatement avant l'emploi. Les conditions opératoires nous ont donc obligés, pour obtenir une résolution suffisante, à augmenter la polarité de nos systèmes de solvants.

1° Lipides neutres

Le couple éther de pétrole-éther semble convenir dans la majorité des cas pour réaliser une séparation suffisante des composants de ce groupe. Il a été utilisé avec succès par de nombreux auteurs. Les phospholipides ne migrent pas et leur isolement est donc facile par ce procédé.

L'éther de pétrole entraîne préférentiellement les esters (stérides, triglycérides) alors que la mobilité de leurs composants (acides gras, cholestérol) est affectée par l'éther.

La présence d'une faible quantité d'acide acétique (1 %) semble améliorer la résolution.

Nous avons successivement expérimenté plusieurs concentrations respectives de ces deux solvants.

Le système éther de pétrole-éther-acide acétique (95-5-0,5), proposé par Vacikova et Coll. [218], donne sur gel de silice G une séparation moins bonne que sur couche de poudre d'alumine.

Les mélanges éther de pétrole-éther-acide acétique (90-10-1 et 60-40-1) donnent, d'après Vogel et Coll. [224] des fractionnements satisfaisants.

Le premier mélange résoud bien les constituants majeurs, mais ne permet pas l'étude des individualités situées entre le cholestérol et les phospholipides.

Le second permet cet isolement car les monoglycérides migrent du spot de départ et les diglycérides sont retrouvés entre le cholestérol et les acides gras libres. Cependant il n'est plus possible de différencier les stérides des triglycérides.

Le remplacement par l'hexane de l'éther de pétrole ne nous a pas donné de meilleurs résultats.

Nous avons employé un système de polarité intermédiaire de composition suivante :

	v/v
Ether de pétrole (E.P. 55-65°)	80
Ether exempt de peroxydes	20
Acide acétique RP	1

Ce mélange, utilisé avec des plaques activées de gel de silice G, est renouvelé tous les jours. La saturation de la cuve par 100 ml de ce mélange est rapide, à 22°C en salle climatisée. Par mesure de précaution, la première migration est réalisée 1 heure après avoir placé le solvant dans l'enceinte chromatographique.

La limite de 10 cm est atteinte en 30 minutes environ. A la sortie de la chambre de séparation, on porte la plaque à l'étuve à 100°C pendant quelques minutes, de manière à fixer les taches et à faire évaporer les dernières traces d'éluant.

2° Phospholipides

Ce groupe demande, pour sa résolution, des solvants nettement plus polaires, et la présence d'eau dans la phase mobile est

utile. Les lipides neutres migreront donc, en bloc, avec le front du solvant, sans subir de fractionnement notable.

Le mélange de développement le plus employé pour l'étude de cette classe, décrit par Wagner [227, 229] et repris par de nombreux auteurs [34, 52, 73, 84, 184], se compose de chloroforme, méthanol et eau dans les proportions 65-25-4 v/v. Le solvant préconisé par Müldner et Coll. [155] est en réalité très voisin puisque les concentrations sont respectivement de 64-24-4.

Pour l'étude des phosphatides majeurs, présents dans des extraits totaux de sérum et de rate, ce système donne des valeurs de Rf assez basses. Les lécithines migrent avec un rapport de 0,39 et seules les céphalines à colamine dépassent les Rf de 0,50.

Pour augmenter ces valeurs nous avons été amené à accroître la polarité et le caractère hydrophile de ce mélange. La concentration en méthanol et en eau distillée a été augmentée et nous avons ajouté à cet ensemble une faible quantité d'acide acétique, bon solvant des lécithines saturées et des sphingomyélines, qui permet la clarification du milieu.

Le mélange, qui nous a fourni les meilleurs résultats, a la composition suivante :

Chloroforme RP	60
Méthanol (distillé)	30
Eau distillée	6
Acide acétique RP	1

La séparation sur plaque de Silicagel G activé, dans une cuve sursaturée, dure de 30 à 45 minutes, en chambre climatisée à 22°C.

Du fait de la moindre volatilité des solvants en présence, il n'est pas utile de renouveler fréquemment le couple de développement. Nous avons obtenu d'excellentes résolutions après emploi de la même phase pendant 8 jours consécutifs.

La migration terminée, la chromatoplaque, portée pendant 5 à 10 minutes à l'étuve à 100°C, est prête à subir le temps de coloration.

E. DÉTECTION ET IDENTIFICATION

Ici se situe un des avantages majeurs de la technique sur couche mince.

Il est possible de faire apparaître les diverses fractions par tous les moyens déjà codifiés pour la chromatographie sur papier, sur papier imprégné et sur fibre de verre. En outre, tous les réactifs, même corrosifs, employés pour la caractérisation analytique ou le dosage, peuvent être utilisés. La seule contre-indication réside dans l'emploi de substances révélatrices nécessitant un lavage ultérieur, vu la faible adhérence de la couche surtout en milieu aqueux.

La coloration successive, par plusieurs agents, est réalisable et fournit des renseignements appréciables.

L'identification des diverses individualités peut se faire par comparaison avec la migration de fractions pures ou par celle de leurs mélanges en proportions déterminées.

Un faisceau de réactions spécifiques permet, en outre, de déterminer avec sûreté la nature d'un spot isolé.

Nous nous sommes assurés également de la spécificité du fractionnement en faisant subir une deuxième chromatographie aux composés que nous avions isolés à partir d'un mélange.

1° Réactifs généraux

a) Un premier examen en lumière ultra-violette permet, dès la sortie de l'étuve, de donner une image assez exacte de la valeur du fractionnement. Pour cela nous avons utilisé un dispositif émissif à 2 tubes, comportant un filtre, ce qui autorise le choix de la longueur d'onde (254 ou 350 mμ).

En vue d'une élution ultérieure des fractions, il suffit d'opérer, par cerclage, la détermination des taches.

b) Nous avons également pulvérisé la surface des chromatoplaques avec de l'acide sulfurique à 50 %. Un séjour de 15 à 20 minutes à l'étuve à 110°C provoque l'apparition de taches brunâtres résultant de la carbonisation des substances organiques.

Le même résultat a été obtenu en opérant avec de l'acide sulfurique saturé en bichromate de potassium.

c) La Rhodamine 6 G en solution à 0,05 % dans l'alcool à 96° développe, en présence de composés lipidiques, une fluorescence sur un fond rosé, lors d'un examen en lumière de Wood.

Il est difficile de photographier par contact les spots décelés. A cause de cela, nous avons abandonné cette méthode de détection.

d) La pulvérisation d'une solution saturée de trichlorure d'antimoine dans le chloroforme, préconisée par Weicker [234], permet de différencier, en lumière ultra-violette, les stérides, le cholestérol et les phospholipides.

Ce procédé a l'inconvénient de ne pas être très spécifique (coloration avec la vitamine A et les stéroïdes) et également de produire, par chauffage, un dégagement de vapeurs très irritantes.

e) La majorité de nos détections ont été obtenues après vaporisations de solutions alcooliques d'acide phosphomolybdique à 15 %. Il importe de faire agir ce réactif sur des chromatoplaques portées

à 105°C et de les maintenir à l'étuve jusqu'à apparition des taches bleues sur fond jaune pâle.

Ce réactif n'est pas très stable, Il doit être préparé extemporanément.

Cet agent de coloration produit des spots très nettement délimités qui se prêtent facilement à la reproduction par photocopie ou photographie. Nous n'avons jamais utilisé ce moyen pour mettre en évidence les fractions destinées aux dosages.

f) En vue des déterminations quantitatives, nous nous sommes adressés à deux réactifs moins agressifs :

— Le séjour, pendant quelques minutes, d'une plaque au contact de vapeurs d'iode provoque l'apparition de taches jaunes ou brunes sur un fond blanc ou jaune pâle. L'examen en lumière ultra-violette augmente le contraste pour de faibles colorations à peine perceptibles en lumière visible. Après cerclage, la plaque est soit portée à l'étuve, soit laissée dans le laboratoire, de manière à provoquer le départ de l'iode adsorbée par les fractions lipidiques.

— La pulvérisation de solution aqueuse alcaline de bleu de bromothymol à 0,04 %, préconisée par Jatzkewiez [90] développe, en présence de lipides, une coloration jaune sur fond bleu. Il importe de ne pas trop imprégner la plaque car la présence d'eau dans ce réactif peut endommager le revêtement.

Avant de pratiquer l'élution, il faut s'assurer qu'il ne reste plus aucune trace d'humidité.

2° Réactions spécifiques des lipides neutres

a) Cholestérol et stérides

La pulvérisation de solutions alcooliques (à 10 %) d'acide silicotungstique ou d'acide silicomolybdique, suivie d'un passage à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes, colore respectivement ces composés en pourpre et en vert.

Nous avons également pu caractériser le cholestérol et les stérides en réalisant sur plaque la réaction de Liebermann [119]. Le mélange qui nous a donné les meilleurs résultats avait la composition suivante :

Anhydride acétique Merck	5 ml
Acide sulfurique RP	5 ml
Ethanol	50 ml

En outre, ces composés ont été identifiés par une réaction au phénol, molybdate, acide perchlorique qui serait spécifique des Δ_4-hydroxy 3-β-stéroïdes (Witter et Stone) [238].

Dans un premier temps on opère une pulvérisation de phénol saturé d'eau. Elle est suivie d'un séchage à l'étuve à 70°C pendant 20 minutes.

Une deuxième pulvérisation a lieu avec le mélange :

Molybdate d'ammonium.....	1 g
Acide perchlorique 60 %.....	25 ml
ClH 0,1 N.....	q.s. 100 ml

Un chauffage à 75-80°C fait apparaître une coloration rose. Le seuil de cette réaction serait obtenu avec une solution contenant 2 μg/ml.

b) Acides gras

Nous avons repris le réactif préconisé par Viswanathan et Meera Bai [223] pour détecter les acides gras libres. La pulvérisation d'une solution à 0,2 % de diphénylcarbazide dans l'alcool à 95° développe une teinte rouge.

D'autre part, la présence d'acides gras est révélée par l'apparition d'une tache jaune après vaporisation d'une solution aqueuse de vert de bromocrésol à 0,04 % (Brown [27, 28] et Braun et Geenen [21]).

c) Glycérides

Mangold, Lamp et Schlenk [129] proposent une méthode intéressante pour caractériser ces composés suivant l'importance de leur copule acide.

La plaque est vaporisée avec une solution de cyclodextrine à 1 % dans l'alcool à 30°. Elle est ensuite abandonnée pendant 1 heure en atmosphère humide puis traitée par les vapeurs d'iode; les monoglycérides sont révélés sous forme de spots blanchâtres sur un fond mauve. En effet, la dextrine est susceptible de former d'emblée avec les glycérides monosubstitués des composés d'inclusion qui présentent la propriété de ne plus se colorer en bleu avec l'iode.

Les acides gras ont cette même propriété et donnent une réaction analogue.

Pour faire apparaître les di- et triglycérides, le même processus est utilisé, après un traitement par une solution de pancréatine à 1 % pendant 24 heures à 37°C. L'hydrolyse enzymatique permet de libérer les acides gras constitutifs et on note l'apparition de taches blanchâtres qui remplacent des taches précédemment colorées en brun violet.

d) *Esters*

Les liaisons esters peuvent être décelées par la réaction de l'hydroxylamine et aux sels ferriques (Feigl) [57].

Nous avons employé la technique suivante :

— Les plaques séchées sont vaporisées avec le réactif alcalin de composition suivante :

Chlorhydrate d'hydroxylamine.....		10 g
Eau distillée.....		25 ml
Ethanol.....	q.s.	100 ml

mélangé à :

Lessive de soude.....		26 ml
Ethanol.....	q.s.	200 ml

Filtrer le précipité.

— Après séchage rapide, nouvelle pulvérisation de la phase éthérée du mélange :

$Cl_3Fe,\ 6H_2O$.....	10 g
HCl 37 %.....	20 g

Homogénéisé au mortier puis extrait par 300 ml d'éther.

La présence de liaisons esters est détectée par l'apparition de spots pourpres sur fond jaune.

3° Réactions spécifiques des lipides phosphorés

a) Coloration du phosphore organique

Plusieurs variantes de réactions molybdiques peuvent être utilisées avec succès sur chromatoplaque.

— A la suite de Wagner et Coll. [229] nous avons pulvérisé une solution de composition suivante :

Molybdate d'ammonium RP.....	3 g
ClH 6 N.....	5 ml
Acide perchlorique à 70 %.....	13 ml
Eau distillée.....	50 ml

Après chauffage à 80°C pendant 10 minutes, les phospholipides développent une coloration gris bleuté ou bleu foncé sur fond blanc.

Les cérébrosides donnent la même réaction.

Si on emploie cette méthode après action de ninhydrine, le fond devient grisâtre mais la teinte des spots n'est pas modifiée.

— Le réactif proposé par Hanes et Isherwood [76] pour les chromatographies sur papier nous a également fourni des résultats satisfaisants.

La composition de ce réactif est la suivante :

Acide perchlorique à 60 %		5 ml
ClH N		10 ml
Molybdate d'ammonium à 4 %		25 ml
Eau distillée	q.s.	100 ml

— Les composés organiques phosphorés peuvent être caractérisés au moyen du réactif suivant décrit par Wade et Morgan [225] :

Acide sulfosalicylique		7 g
Cl_3Fe, 6 H_2O		0,1 g
Eau distillée		25 ml
Ethanol 95°	q.s.	100 ml

Après pulvérisation, on note l'apparition des spots blancs fluorescents sur fond rouge violacé.

b) Choline

Nous décrirons uniquement les réactions qui semblent les plus spécifiques de ce constituant.

— Le réactif de Dragendorff, suivant le mode opératoire proposé par Wagner [229], permet de différencier la base libre des dérivés choliniques. On obtient ce réactif en mélangeant, extemporanément, les deux solutions suivantes, qui, isolées, sont de bonne conservation.

Solution I :

$(NO_3)_3Bi$, 5 H_2O	1,7 g
CH_3COOH 20 %	100 ml

Solution II :

IK	40 g
Eau distillée	100 ml

Au moment de l'emploi on opère la dilution :

Solution I : 4 ml
Solution II : 1 ml
Eau distillée : 20 ml

La vaporisation modérée de ce mélange produit, à température du laboratoire, une teinte rouge pourpre en présence de choline libre et une teinte jaune pour les dérivés choliniques.

— La réaction de Chargaff [34] peut également être appliquée sur chromatoplaques en utilisant la technique suivante :

Une première vaporisation d'une solution alcoolique à 1 % d'acide phosphomolybdique est suivie par un passage à l'étuve à 100°C pendant 3 minutes.

Une seconde vaporisation est alors effectuée avec une solution, fraîchement préparée, de chlorure stanneux à 1 % dans de l'acide chlorhydrique 3 N.

Après chauffage à 100 % pendant 10 minutes, on note l'apparition de spots bleus décelant la présence de choline.

c) Aminophosphatides

Le groupement aminé, présent dans les céphalines, peut être détecté par la réaction à la ninhydrine.

Nous avons indifféremment utilisé une solution à 0,2 % de ninhydrine dans l'acétone ou dans le n-Butanol saturé d'eau, ou dans le mélange Lutidine-Butanol saturé d'eau (5-95 vv).

Une réaction positive se traduit par l'apparition, après chauffage à l'étuve à 80°C, d'une tache rouge pourpre sur fond blanc.

Une sensibilisation de cette technique, par l'exposition préalable aux vapeurs de diéthylamine, ne nous a pas donné de modification appréciable (Circo) [25].

d) Liaisons acétal

Reitsemia [179], Demole [49, 50] et Skipski [198] opèrent la révélation des composés aldéhydiques au moyen de 2-4 dinitrophénylhydrazine.

La pulvérisation d'une solution à 1 %, de cette substance dans l'acide chlorhydrique 2 N développe en présence d'acétal-phosphatides, une coloration brunâtre sur fond blanc.

Nous avons, en outre, employé le réactif de Schiff préparé comme suit :

Dissoudre à chaud :

Fuchsine basique.....	1 g
Eau distillée.....	200 ml

après refroidissement à la température du laboratoire ajouter :

Bisulfite de soude à 30 % Prolabo.....	3,5 ml
(ou métabisulfite de soude : 2 g).	

Boucher et laisser reposer 24 heures à l'obscurité. Filtrer (sur charbon si nécessaire), puis ajouter :

Acide chlorhydrique 2 N.....	20 ml

La décoloration est complète en 24 heures.

Le réactif se conserve au froid, en flacons bien bouchés.

En présence de plasmalogènes, on obtient, après pulvérisation, une coloration rose fugace sur fond blanc.

e) *Inositol-Phosphatides*

Nous avons suivi la technique décrite de la réaction de Scherer et Gallois appliquée à la chromatographie sur papier par Fleury, Courtois et Malangeau [60].

— On soumet les plaques à une pulvérisation de réactif de Meillère :

Oxyde mercurique		1 g
NO_3H (d. 1,4)		10 g
Eau distillée	q.s.	200 ml

Ce réactif est dilué au demi avant l'emploi.

— Après 10 minutes le contact à l'étuve à 85-100°C, pulvériser avec le réactif :

Acétate de baryum à 10 %		15 ml
Acide acétique RP	q.s.	100 ml

Porter à nouveau à l'étuve pendant 2 minutes.

— Ce dernier traitement doit être, éventuellement, répété quatre fois.

La présence d'inositol est signalée par l'apparition de taches roses.

Skidmore [197] propose l'emploi du nitrate d'argent ammoniacal comme moyen d'identifier l'inositol et le glycérol.

Les chromatoplaques séchées sont soumises à la pulvérisation du mélange :

NO_3Ag 0,1 N
Ammoniaque 7 N } â â

puis chauffées à 110°C jusqu'à formation des spots bruns foncés sur fond blanc.

Cette coloration peut n'apparaître qu'au bout de plusieurs heures.

f) *Glycolipides*

Pour caractériser cette classe lipidique nous nous sommes adressé à la pulvérisation du mélange :

Solution alcool. de diphénylamine à 10 %		20 ml
Acide chlorhydrique Merck		100 ml
Acide acétique Merck		80 ml

On obtient après séjour à l'étuve à 110°C, pendant 5 à 10 minutes, des spots bleus sur fond gris.

Certaines fractions, après détection par les vapeurs d'iode ou le bleu de bromophénol, ont été isolées des plaques. Nous avons tout simplement détaché, en grattant avec un bristol, le support sur

lequel elles étaient adsorbées. Ce procédé a été préféré à l'aspiration par le vide qui nécessite, pour ne pas être entaché d'erreurs, un nettoyage très complet du dispositif entre chaque fraction.

Nous pouvons traiter le Silicagel ainsi obtenu, à plusieurs reprises, par un éluant approprié dans un tube à centrifuger pour extraire les diverses individualités.

Il convient, pour chaque prélèvement, d'effectuer un témoin avec une même surface d'adsorbant, occupant un emplacement identique par rapport à la ligne de départ. Les dosages ont ensuite été effectués avec les microméthodes employées pour l'extrait lipidique total ou le sérum.

F. ÉVALUATION SEMI-QUANTITATIVE

Le résultat de chaque chromatoplaque est photocopié au moyen d'un appareil « Polymicro ». Les négatifs sont souvent très détaillés et présentent un contraste supérieur à celui des positifs qu'ils permettent d'obtenir.

Certaines colorations plus délicates ont été photographiées sur films « Kodakrome » I ou II.

Selon la luminosité, l'ouverture est de l'ordre de F_8 à F_{11}, pour une vitesse d'obturation de 1/30^e avec le « Kodakrome » I.

Nous avons tenté d'enregistrer, au moyen d'un densitomètre « Photovolt » couplé avec un enregistreur « Varicord », les reproductions, par polycopie, des colorations obtenues après action de l'acide phosphomolybdique. Le résultat obtenu ne peut être considéré comme absolument quantitatif (vu l'absence de filtre compensateur et la transposition sur papier photographique). Néanmoins, ce procédé permet de montrer, d'une manière quelque peu grossière, par une représentation graphique, l'importance des composés fractionnés.

IV. Dosages chimiques

Les quantités isolées sur les plaques étant très faibles nous n'avons employé, pour nos déterminations quantitatives, que des microméthodes.

Nous avons pu ainsi doser par les mêmes techniques les éléments sur le matériel de départ (sérum ou extrait lipidiques) et sur les diverses fractions obtenues.

A. DOSAGE DU CHOLESTÉROL (MÉTHODE Agneray, Puiseux, Wepierre) [3]

Cette technique a été choisie car elle emploie une coloration au perchlorure de fer, beaucoup plus sensible que la réaction de Lie-

BERMANN [119]. Les deux fractions libres et estérifiées sont isolées (et non obtenues par différence) et leur évaluation est effectuée par rapport à des solutions témoins de cholestérol libre et d'esters de cholestérol.

Réactifs :

R I :

Perchlorure de fer		1,25 g
Acide acétique RP	q.s.p.	1 000 ml

R II :

Chloroforme RP		200 ml
Acétate d'éthyle		400 ml

R III : Solution étalon de cholestérol libre :

Cholestérol		166,6 mg
R II	q.s.p.	1 000 ml

R IV : Solution étalon d'esters de cholestérol :

Stéarate de cholestérol		141 mg
Palmitate de cholestérol		134 mg
R II	q.s.p.	1 000 ml

Coloration :

— Reprendre isolément les deux fractions (stérols et stérides) par :

Chloroforme..... 1 ml

puis par : acétate d'éthyle..... 1 ml (à 2 reprises)

— faire une gamme de cholestérol libre et une gamme d'esters contenant de 50 à 500 μg de cholestérol,

— compléter les tubes de ces gammes à 3 ml avec le mélange Chloroforme-acétate d'éthyle (1-2),

— ajouter ensuite aux témoins et aux essais :

R I	2 ml
SO_4H_2	3 ml

— mélanger.

— Après 1 heure de contact, à la température du laboratoire, lire au spectrophotomètre à 560 mμ.

B. DOSAGE DES ESTERS D'ACIDES GRAS

Les acides gras présents sous forme estérifiée dans les diverses classes de lipides, ont été déterminés par la technique de BAUER et HIRSCH [13 *bis*] modifiée par JARRIER et POLONOVSKI [89 *bis*]. Ils sont transformés par l'action du chlorhydrate d'hydroxylamine, en acides hydroxamiques, qui en présence de perchlorate

ferrique, développent une coloration rouge violacée permettant un dosage photométrique.

Réactifs :

— Solution d'hydroxylamine (à conserver à + 4°C) :

ClH, NH_2OH	2,5 g
Alcool à 95°	100 ml

— Soude alcoolique :

NaOH	2,5 g
Alcool à 95°	100 ml

— Solution Stock de perchlorate ferrique :

$Cl_3Fe, 6\ H_2O$	1,16 g
Eau distillée	20 ml
NO_3H	3 ml
ClO_4H	15 ml

Chauffer jusqu'à émission de fumée.

Après refroidissement, ajouter :

Eau distillée		40 ml
NO_3H		10 ml
ClO_4H	q.s.	100 ml

— Solution diluée de perchlorate ferrique (à préparer extemporanément) :

Solution Stock		5 ml
Alcool à 95°	q.s.	100 ml

— Solution étalon :

Monobutyrine	165 mg
Ether	100 ml

Cette solution-mère est diluée au 1/10e, avec de l'éther au moment de l'emploi. Un millilitre de cette solution diluée contient 1 mEq d'acide gras.

Technique :

— Les prises d'essai doivent contenir de 2 à 10 μg de P.

— On évapore à sec le contenu des tubes.

— On reprend le résidu par :

0,3 ml de solution alcoolique d'hydroxylamine,
0,3 ml de solution alcoolique de soude.

— Après 1 heure de contact, à la température du laboratoire, on ajoute :

10 ml de solution diluée de perchlorate ferrique.

— Les tubes sont portés au bain-marie à 25°C pendant 20 mn.
— On opère la lecture au spectrophotomètre à 520 mμ.
— On peut faire une lecture de vérification 1 heure après.

C. DOSAGE DU PHOSPHORE

Nous avons utilisé la technique de Delsal et Manhouri [47] qui, après minéralisation du phosphore organique par l'acide sulfurique et l'eau oxygénée, font agir le molybdate d'ammonium en milieu réducteur. La coloration bleue ainsi obtenue permet un dosage colorimétrique.

Réactifs :

— Perhydrol Merck.
— MnO_4K, 0,01 N.
— Oxalate d'ammonium 0,01 N.
— Solution de molybdate d'ammonium 5 %.
— Solution d'hydroquinone à 1 % (à préparer extemporanément).
— Solution de sulfite de sodium à 20 %.
— Solution étalon de phosphore :

PO_4H_2K	439 mg
Eau distillée	1 000 ml

(Cette solution-mère est diluée au 1/8e au moment de l'emploi. Deux millilitres de cette solution diluée contiennent 25 μg de phosphore.)

Technique :

— Les prises d'essai ainsi que le contenu des tubes de la gamme étalon (allant de 3,125 à 150 μg de P) sont évaporés à sec sur un nid chauffant.

— Le résidu est repris par 0,5 ml de SO_4H_2 concentré très pur (Merck) et chauffé jusqu'à calcination et dégagement d'anhydride sulfureux.

— Après refroidissement, on ajoute 1 goutte d'eau oxygénée à 110 vol. (Perhydrol).

— On chauffe légèrement jusqu'à décoloration.

Il est parfois nécessaire de renouveler à plusieurs reprises cet apport d'eau oxygénée.

— Après décoloration complète de tous les tubes, on chauffe pendant 4 heures consécutives.

— Après refroidissement, on ajoute 8 ml d'eau distillée et on porte au bain-marie bouillant pendant 20 minutes.

— On verse dans chaque tube, goutte à goutte, du permanganate jusqu'à teinte rose pâle, puis on décolore avec une goutte de solution d'oxalate d'ammonium. On ajoute ensuite successivement à chaque tube et dans l'ordre :

2 ml de solution de molybdate d'ammonium,
1 ml de solution d'hydroquinone,
1 ml de solution de sulfite.

Après avoir soigneusement mélangé on laisse la coloration se développer à l'obsucrité pendant 20 minutes, puis on lit au photomètre muni d'un écran jaune orangé.

D. DOSAGE DES BASES AZOTÉES

La recherche de la choline, contenue principalement dans les lécithines et les sphingomyélines (80 % des bases totales) est effectuée par le réactif de Chargaff ou par celui de Dragendorff.

Son dosage peut être réalisé, après hydrolyse, par diverses méthodes :

— des méthodes pondérales,
— des méthodes volumétriques basées sur la formation de periodure de choline,
— des méthodes colorimétriques.

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique au reineckate d'ammonium.

L'hydrolysat est traité par une solution de reineckate d'ammonium à 2 % dans ClH, 2 N. Le précipité de reineckate de choline, après lavage est mis en solution dans l'acétone et développe une coloration rouge dont l'intensité peut être évaluée au photomètre.

On peut établir, pour chaque phospholipide, la valeur du rapport choline/phosphore. Pour les lécithines, ce quotient est égal à 1.

V. Chromatographie sur papier imprégné à l'acide silicique

La séparation des groupes de lipides et leur mise en évidence peut être effectuée par chromatographie sur papier. Hack [74] utilise une technique radiale simple sur des disques de papier Whatmann n° 1. L'extrait est déposé au centre du disque et le chromatogramme est développé par des solvants (chloroforme, méthanol, etc.) appliqués au point de départ à l'aide d'une micropipette.

Rouser, Marinetti, Witter, Berry et Stotz [188] ont opéré de tels fractionnements avec ou sans acétylation préalable des lipides. Leurs divers éluants contiennent de l'acide acétique et des solvants polaires (pyridine, méthanol et cétones en C_5 et C_7). Ces auteurs

pensent que de faibles quantités d'acide acétique se fixent sur le papier et jouent le rôle de phase stationnaire dans laquelle les phospholipides sont assez solubles, ce qui ralentit leur migration.

Les résultats obtenus par ces méthodes sont assez peu convaincants.

Un progrès considérable dans ce domaine a été réalisé lorsque Lea et Coll. [112], puis Marinetti et Coll. [133, 136, 137] ont préconisé l'emploi de papier imprégné d'acide silicique.

Les meilleurs fractionnements ont été obtenus grâce à des mélanges de chloroforme-méthanol et de diisobutyl-cétone-acide acétique.

Avec ce nouveau support, la solution obéit à la fois à des phénomènes d'adsorption et à des phénomènes de partage.

Nous avons opéré le fractionnement des extraits sur papier imprégné. Nous n'en décrirons pas la technique, le matériel, les solvants ni les réactions de caractérisation.

V. Expérimentation avec du ^{32}P

L'emploi d'isotopes radio-actifs comme agents de révélation des fractions sur chromatoplaques a été signalé par Mangold [125]. Cet auteur parle de la séparation de composants ou de mélanges dont les groupements fonctionnels avaient fixé un réactif contenant des radio-isotopes. Ainsi, les acides gras peuvent être marqués par estérification avec du diazométhane radio-actif. De même, les lipides hydroxylés ou aminés sont capables de fixer de l'anhydride acétique radio-actif.

Brown et Johnston [29] ont opéré, sur couche mince, le fractionnement des lipides neutres de la muqueuse gastrique du hamster après injection ^{14}C et ^{3}H.

La chromatographie sur couche mince n'a pas, à notre connaissance, été utilisée pour la détection et l'analyse des phosphatides marqués par du ^{32}P.

En 1957, Marinetti et Coll. [134] décrivent l'application des méthodes chromatographiques sur papier à l'étude de l'incorporation de phosphate marqué dans phosphatides d'homogénat de foie de rat. Un an plus tard, cet auteur [135] mesurait l'activité spécifique de plusieurs phospholipides tissulaires de rat après injection du matériel radio-actif.

Opérant *in vivo* sur le rat, Paysant-Diament, Budon et Polonovski [158] notaient que l'incorporation de ^{32}P était plus rapide dans le sérum que dans les globules.

Polonovski et Coll. [167] ont, en outre, employé *in vivo* et *in vitro*, le phosphore et le glucose marqués, pour suivre par chroma-

tographie sur papier imprégné, le métabolisme des lipides spléniques chez le rat.

Ils ont utilisé la même technique pour l'étude du métabolisme des phospholipides du sang, explorant successivement les fractions plaquettaires [159], leucocytaires [160] puis érythrocytaires [161, 162].

Technique utilisée :

Nous nous sommes inspirés, pour l'expérimentation sur l'animal, des techniques exposées dans ces précédents travaux. Le rat a été préféré pour son poids réduit et pour l'importance de la fraction lysolécithinique dans ses lipides.

Les animaux prélevés dans un lot homogène de même souche et du même âge, pesaient environ 150 g (± 10 g).

Nous avons injecté, par la voie sous-cutanée dans la région lombaire, 1 mc de ^{32}P, ortho-phosphate dans 2 ml de solution de phosphate de sodium 0,1 M amenée à pH 7,4.

Les rats étaient sacrifiés 3 heures, 6 heures, 9 heures et 24 heures après l'injection.

Pour obtenir le maximum de sang, nous procédions, après anesthésie à l'éther, à la ponction de la jugulaire selon la technique de Griffith et Jeffers [69]. Le sang, recueilli sur héparine, était immédiatement centrifugé et le plasma, séparé des globules, était traité par le méthanol puis par le chloroforme. L'extrait n'était pas soumis à la purification selon Folch [62].

Après séparation des fractions phosphatidiques par chromatographie sur couche mince, selon la technique indiquée page 81, les plaques étaient fixées par un bref passage à l'étuve à 100°C.

Un film radiographique « Kodak » sans écran était appliqué, au moyen d'une plaque de verre de mêmes dimensions, la surface sensible étant au contact de l'adsorbant. L'ensemble était solidement fixé avec un ruban adhésif et conservé à l'obscurité complète.

L'exposition de ces autoradiogrammes durait de 3 à 4 jours. Le temps de développement à 20°C était de 4 minutes, dans le révélateur « Kodak » approprié. Il était suivi d'un séjour de 15 minutes dans un bain de fixateur acide et d'un lavage prolongé à l'eau courante.

Nous avons également pratiqué sur papier imprégné d'acide silicique une chromatographie de ces extraits radio-actifs, mais le dépôt de phospholipides étant moins important nous avons dû porter la durée d'exposition à 15 jours. Les radiogrammes ainsi obtenus étaient révélés et fixés de la même manière que ceux provenant des chromatoplaques.

B. RÉSULTATS

I. Lipides sériques

A. LIPIDES NEUTRES

L'isolement et le fractionnement de l'extrait lipidique total nous a permis d'obtenir un certain nombre de résultats.

Les diverses méthodes d'extraction employées ne donnent pas de différence appréciable. Nous avons obtenu, à partir de sérums humains de sujets sains, des teneurs en lipides totaux variant entre 5,3 g et 9,10 g ‰.

Nous n'avons pas observé de diminution notable de poids en utilisant la purification selon Folch. Cette méthode n'a d'ailleurs été utilisée que pour des extraits préparés avec une quantité supérieure à 10 ml de sérum.

1° Chromatographie en couche mince

Les diverses méthodes de coloration, ainsi que la migration de solutions pures de substance témoin, nous ont permis de caractériser sur les microchromatogrammes obtenus avec le solvant éther de pétrole-éther-acide acétique (80-20 1 v/v) plusieurs fractions que nous allons envisager séparément (figure 3).

Nous notons sur cette figure, comme nous l'avons toujours fait, la présence constante en front d'une bande fluorescente aux ultraviolets et colorée également par tous les agents de détection. Le développement préalable des chromatoplaques par le chloroforme ou le mélange chloroforme-méthanol (2-1 v/v) comme le propose Seher [193] n'a pas fait disparaître cet élément. Il serait dû à la migration des hydrocarbures ou de lipides d'origine exogène.

— La tache VIII migre avec le front du solvant. Son Rf est voisin de 1 (0,95-0,98). Elle se colore par les réactions à l'acide silicotungstique et silico-molybdique, ainsi que par la réaction de Liebermann.

Elle ne contient, en outre, ni phosphore, ni base azotée.

Cette fraction représente les stérides et son Rf est identique à celui d'un témoin de palmitate de cholestérol.

Nous avons parfois, pour certains extraits, obtenu un deuxième spot décelé par les mêmes agents possédant un Rf de

l'ordre de 0,90. Nous n'avons pas pu l'identifier avec précision. Il doit contenir, selon Zollner, Wolfram et Amin [242, 243] des stérides à acides gras éthéniques ou polyéthéniques.

Fig. 3.

Chromatoplaque. Fractionnement des lipides neutres du sérum. Coloration : acide phosphomolybdique :

1. Témoin de palmitate de cholestérol;
2. Témoin de cholestérol libre;
3. Extrait sérique;
4. Témoin d'acide oléique;
5. Témoin de trioléine.

— La tache VII de Rf 0,70-0,80 est révélée par l'acide phosphomolybdique et par les vapeurs d'iode, ainsi que par la réaction à l'hydroxylamine et aux sels ferriques. Le test à la dextrine et à

l'iode n'est positif qu'après hydrolyse enzymatique de 24 heures par la pancréatine en chambre humide à 37°C. Son Rf est identique à celui d'un témoin de trioléine. Le spot est donc constitué par des triglycérides.

— La tache VI est révélée par l'acide phosphomolybdique. Son Rf est de 0,35-0,40. Par comparaison avec la migration d'un témoin d'acide oléique nous pouvons l'identifier à des acides gras libres. Les colorations obtenues par la solution de diphényl-carbazide ou la solution aqueuse de vert bromocrésol sont faiblement positives.

— Les taches V et III de Rf 0,22 et 0,12 sont détectées par la réaction hydroxamique. Le premier spot donne, paradoxalement, une réaction d'emblée avec la dextrine et l'iode; le spot inférieur ne donne cette réaction qu'après hydrolyse. Brown et Johnson [29] avec un éluant voisin, rendu plus polaire par l'adjonction de méthanol, signalent la présence de 1-3 diglycéride et de 1-2 diglycéride de part et d'autre du cholestérol. Nous penchons donc pour cette interprètation.

— La tache IV migrant avec un Rf de 0,18-0,20 donne une coloration verte avec le réactif de Liebermann. Nous avons également obtenu une coloration rose spécifique des Δ_5 hydroxy-3-β-stéroïdes après pulvérisation par le phénol et par le molybdate-acide-perchlorique.

Nous sommes en présence de cholestérol libre, ainsi d'ailleurs que le confirme une migration identique de solution témoin.

— La tache II apparaît dans notre système chromatographique comme un croissant blanc, qui coiffe le dernier spot. Cette disposition est particulièrement visible avec la coloration à l'iode, après action de la dextrine. Ceci nous permet de déceler un début de migration des monoglycérides.

— La tache I n'est pas entraînée par le solvant. Elle est colorable par les réactifs du phosphore, ainsi que par ceux de la choline (Dragendorff, Chargaff). Au cours de l'expérimentation avec du ^{32}P nous n'avons obtenu, avec l'éluant des lipides neutres, aucune migration d'éléments radio-actifs. Nous pouvons donc affirmer que les phosphatides se retrouvent entièrement sur la piste de départ.

Nous n'avons pas pu effectuer directement, comme l'a décrit van Dam [221], le fractionnement des lipides neutres à partir du sérum.

En outre, le solvant préconisé par Marinetti [136] heptane-disiobutycétone (96-6 v/v) pour les séparations sur papiers imprégnés, ne nous a pas donné des résultats reproductibles pour son utilisation sur chromatoplaques.

2° Détermination quantitative

Lors de l'étude quantitative nous n'avons pas pu doser les fractions contenant les divers glycérides (mono et diglycérides étant uniquement caractérisés par des techniques accessoires) ni celles renfermant les acides gras libres. Si la détermination de ces derniers composés est réalisable sur l'extrait ou sur le sérum, nous n'avons pas pu pratiquer leur évaluation quantitative dans l'éluat de l'acide Silicique par le mélange extractif isopropanol-heptane-SO_4H_2N (40-10-1).

Pour les autres individualités nous avons réalisé des chromatographies préparatives en déposant 9 pistes par plaque.

L'élution a été effectuée :

— par de l'éther de pétrole pour les stérides,

— par un mélange éther de pétrole-éther (1-1) pour le cholestérol,

— par le mélange chloroforme-méthanol (2-1) pour les phospholipides.

Nous avons obtenu les résultats mentionnés dans le tableau suivant (tableau 19) :

Sérum (Lipides totaux g ‰)	Dépôt (µg de lipides)	P µg	PHOSPHOLIPIDES µg (P µg x 25)	PHOSPHOLIPIDES % du dépôt lipidique	CHOLESTÉROL µg	CHOLESTÉROL % du dépôt lipidique	STÉRIDES µg	STÉRIDES % du dépôt lipidique	Rapport d'estérification
5,33	533	5	125	23,4	45	8,4	149	26	0,76
6,59	528	5,4	135	25,7	52	9,9	133	25,2	0,72
7,80	441	6,3	157	35,5	43	9,8	118	26,7	0,73
8,02	541	6,7	167	30,8	50	9,2	145	26,8	0,74
9,12	460	5,5	137	29,9	40	8,7	130	28,3	0,76
8,20	456	5,1	132	28,0	48	10,5	112	24,5	0,70
				28,8		9,4		26,2	0,73

Tableau 19

Évaluation des fractions isolées par chromatographie en couche mince avec le mélange éther de pétrole-éther-acide acétique (80-20-1)

3° Enregistrement

L'enregistrement photodensitométrique obtenu à partir d'une reproduction de la chromatoplaque décèle les diverses fractions rencontrées dans les extraits (figure 4).

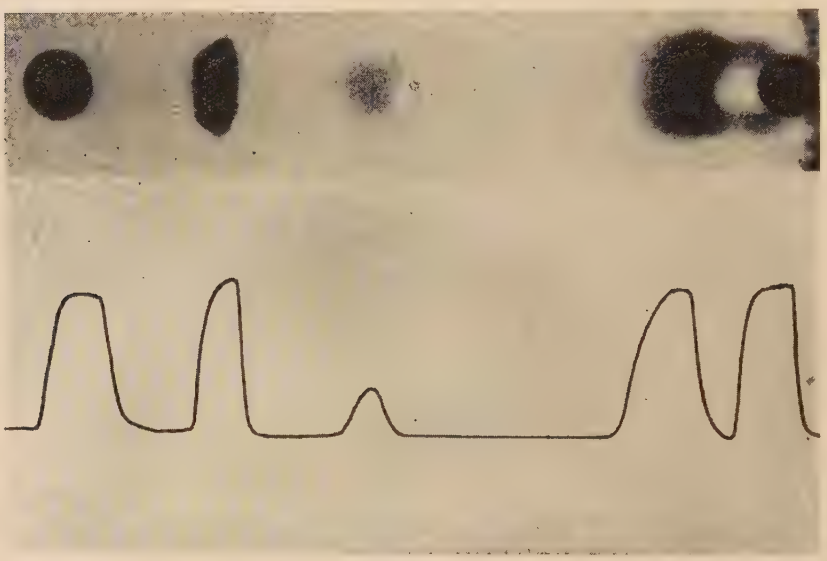


Fig. 4.

Enregistrement photodensitométrique d'une chromatoplaque après franctionnement des lipides neutres. Coloration: acide phosphomolybdique

Cette représentation graphique permet de calculer plus aisément les Rf et de mieux individualiser les spots. Nous ne saurions cependant, vu l'affinité différente des diverses individualités pour l'acide phosphomolybdique, lui accorder une signification quantitative.

4° Comparaison avec les séparations sur papier imprégné d'acide silicique

Nous avons également réalisé la comparaison des résultats obtenus sur chromatoplaques avec ceux donnés par le papier imprégné d'acide silicique et le solvant heptane-diisobutyl-cétone (96-6 v/v).

Après coloration par la Rhodamine 6 G (figure 5) nous avons révélé la présence de plusieurs composants. Nous obtenons 6 taches.

Avec le front du solvant nous retrouvons une bande fluorescente déjà signalée au sujet des chromatoplaques. L'épuisement préalable du papier par le solvant n'a d'influence notable, ni sur son intensité, ni sur ses dimensions.

Fig. 5.

Schéma de chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique. Fractionnement des lipides neutres du sérum.

A. Coloration du cholestérol;

B. Coloration à la Rhodamine 6 G.

— La tache VI qui migre avec un Rf voisin de l'unité (0,95) est également détectée par les réactions des stéroïdes. Elle renferme les esters du cholestérol.

— La tache V possédant un Rf de 0,75 est due à la présence de triglycérides.

— La tache IV est assez mal individualisée. Ayrault-Jarrier [9] pense qu'elle révèle l'existence d'acides gras libres.

— La tache III de Rf 0,35, détectée par l'acide silicotungstique et par la réaction spécifique des Δ_5 hydroxy-3-β-stéroïdes, est du cholestérol.

— La tache II se présente sous forme d'une traînée assez mal différenciée. Elle renferme les Diglycérides et les Monoglycérides.

— La tache I reste à l'origine. Elle est colorée par les réactions du phosphore et des composés choliniques (phospholipides).

Au cours du fractionnement, sur papier imprégné, de composés contenant du P marqué nous avons noté, sur les autoradiogrammes, la présence d'une traînée noirâtre. Celle-ci était-elle le signe de la contamination de l'extrait par du phosphore minéral ou décelait-elle un défaut de spécificité du solvant pour les lipides neutres ?

B. PHOSPHOLIPIDES

1° Chromatographie en couche mince

Nous avons également réalisé le fractionnement des mêmes extraits lipidiques totaux, sur couche adsorbante de Silicagel G, pour déceler leur composition en lipides phosphorés.

Il nous a été possible, pour identifier plus surement les individualités phosphorées, d'employer des témoins purs ou des mélanges de phosphatides utilisés en biologie et en sérologie.

Avec le développement par le mélange chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60-30-6-1), nous avons pu, à l'aide de plusieurs agents de détection, caractériser sept taches correspondant aux fractions suivantes (figure 6) :

— En front, une ligne continue, tache VII, colorée par l'acide phosphomolybdique et les vapeurs d'iode, correspond à la migration d'hydrocarbures.

— Les taches V et VI très près du front, donnent une réaction de Liebermann positive.

L'acide silicotungstique et le trichlorure d'antimoine permettent de mieux déceler une tonalité différente que l'on peut attribuer aux stérides et au cholestérol libre. D'autres lipides neutres, non individualisés migrent également de part et d'autre de ces deux spots supérieurs. Sur des autoradiogrammes obtenus avec des extraits lipidiques de rat, après injection de ^{32}P, nous avons

observé, à ce niveau, assez mal différenciée par les réactions colorées, une tache phosphorée en forme de croissant, vraisemblablement due à des acides phosphatidiques ou à des polyglycérophosphatides. Toutes les fractions suivantes sont détectées par les réactifs du phosphore organique (Hanes et Isherwood [76] et Wade et Morgan [225]).

Fig. 6.

Chromatoplaque. Fractionnement des phospholipides du sérum. Coloration à l'acide phosphomolybdique :

1. Réactif de Hanger;
2. Témoin de lécithine;
3. Extrait sérique;
4. Mélange témoin (lysolécithine, lécithine, céphaline, cholestérol).

La tache IV peu marquée dans le sérum est parfois dédoublée. Elle ne contient pas de choline, mais une coloration par pulvérisa-

tion de solution acétonique de ninhydrine signe la présence d'aminophosphatides.

Le spot inférieur d'un témoin de réactif de Hanger migre avec un Rf analogue. Cette fraction contient donc les céphalines, en assez faible quantité dans les extraits sériques.

— La tache III est très importante. Son Rf est voisin de 0,50. Elle contient des composés choliniques et nous avons pu l'identifier avec certitude à la phosphatidylcholine grâce à un témoin d'ovolécithine.

— La tache II d'intensité moins notable contient également de la choline et donne une réaction positive après pulvérisation d'une solution acide de diphénylamine. Elle correspond à la sphingomyéline. Nous avons, en outre, obtenu, à ce niveau un test positif à la ninhydrine qui semble un argument favorable pour déceler l'existence de la lysocéphaline.

— La tache I est colorée par le réactif de Dragendorff et par celui de Chargaff. Son Rf est assez constant, de l'ordre de 0,20, 0,25. Elle renferme la lysophosphatidylcholine.

Entre ce spot inférieur et l'origine, nous avons maintes fois rencontré une traînée fournissant une réaction positive à la ninhydrine.

La pulvérisation d'acide phosphomolybdique révèle une tache blanchâtre qui vire au bleu clair après 24 heures. Cette formation est détectée par la coloration du phosphore selon Wade et Morgan [225], ainsi que par le réactif de Schiff.

Nous nous proposons d'étudier d'une manière plus complète la fraction ainsi isolée.

Avec ce système de solvants il ne se produit aucune réaction colorée caractéristique du phosphore sur la piste de départ.

Le solvant de Marinetti [132], diisobutyl-cétone-acide acétique-eau (40-25-5), employé sur chromatoplaques de Silicagel activé, permet une migration des phosphatides. Cependant, le fractionnement manque de netteté et les résultats ne peuvent être comparés à ceux obtenus par le même système sur papier imprégné.

L'emploi de couches minces de cellulose contenant de l'acide silicique n'a pas amélioré la résolution des lipides phosphorés.

Il n'est donc pas possible, tant pour les lipides neutres que pour les phospholipides, d'effectuer par chromatographie en couche mince, l'étude des diverses fractions en employant les systèmes de solvants proposés par Marinetti [132] pour la technique sur papier imprégné.

2° Détermination quantitative

Après chromatographie préparative sur chromatoplaques de Silicagel G, avec le mélange chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60-30-6-1) nous avons dosé le phosphore dans chaque fraction.

Nous avons obtenu les résultats mentionnés dans le tableau suivant (tableau 20) :

Dépôt µg P	LYSOLÉCITHINE µg	LYSOLÉCITHINE P % du P déposé	SPHINGOMYÉLINE µg	SPHINGOMYÉLINE P % du P déposé	LÉCITHINE µg	LÉCITHINE P % du P déposé	CÉPHALINE µg	CÉPHALINE P % du P déposé	TOTAL µg	TOTAL P % du P déposé
90	6,8	7,5	7,3	8,1	62,1	69	6,2	6,9	82,4	90,1
97,2	6,5	6,6	7,8	8,0	64,3	65,9	4,7	4,8	83,3	84,9
113,4	8,2	7,2	9,1	8,0	74,7	65,8	5,6	4,9	97,6	86,0
120,6	8,6	7,1	8,4	6,9	78,4	65,0	7,1	5,9	102,5	85,0
99	7,4	7,4	7,8	7,8	66,1	66,7	5,1	5,1	86,4	87,2
91,8	6,4	6,9	7,2	7,8	61,5	66,9	6,8	7,3	82,9	90,3
Moyenne		6,7		7,7		66,5		5,8		87,2

Tableau 20

Dosage du phosphore dans les fractions isolées par chromatographie en couche mince avec le mélange chloroforme-méthanol-acide acétique-eau (60-30-6-1)

3° Enregistrement

L'enregistrement photodensitométrique d'une reproduction de la chromatoplaque *après coloration* par l'acide phosphomolybdique, montre les diverses fractions phosphorées rencontrées dans les extraits sériques (figure 7).

4° Comparaison avec le fractionnement sur papier imprégné d'acide silicique

Sur papier imprégné d'acide silicique, nous avons pu fractionner l'extrait total avec le solvant diisobutyl-cétone-acide-acétique-eau (40-25-5), plusieurs individualités lipidiques formant 6 taches (figure 8).

Après coloration par la rhodamine 6 G, nous retrouvons toujours en front une bande, tache VI, assez importante, due à la migration d'hydrocarbures ou de composés lipidiques non identifiés.

— La tache V de Rf voisin de l'unité (0,95) est colorée par la rhodamine 6 G, et par la réaction de Liebermann. Elle ne contient ni phosphore ni base azotée.

Cette fraction correspond à la migration des lipides neutres (stérides et cholestérol, glycérides et acides gras libres).

La tache IV de Rf 0,50 contient du phosphore. Elle est parfois séparée en deux parties. Elle donne un test positif après pulvérisation de ninhydrine et de réactif à la 2-4-dinitrophényl-hydrazine. Cette fraction représente les céphalines (à éthanolamine et à sérine) existant à la fois sous forme d'esters et d'acétals.

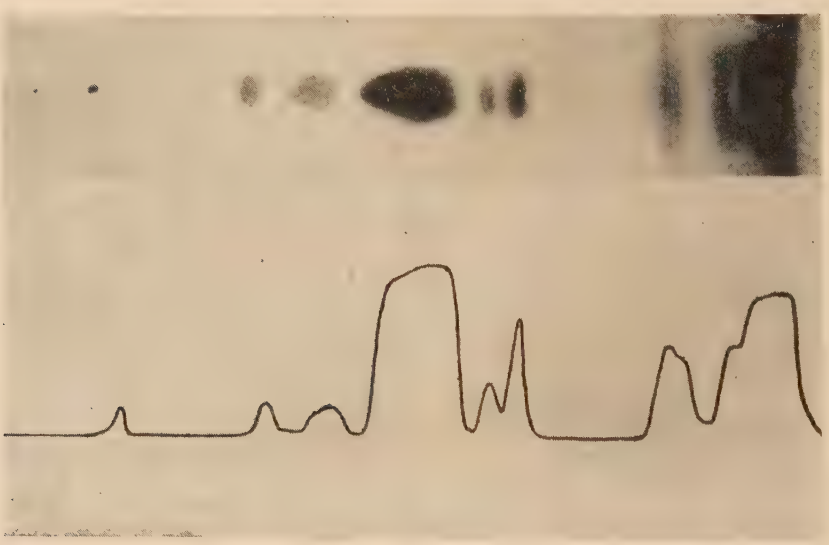


Fig. 7.

Enregistrement photodensitométrique après fractionnement des phospholipides du sérum. Coloration : acide phosphomolybdique

- La tache III, également phosphorée, possède un Rf de 0,45.

Elle est décelée par l'acide phosphomolybdique et le chlorure stanneux et par le réactif de Dragendorff. Cette fraction, phosphorée et cholinique, représente les lécithines.

La tache II de Rf 0,40 est détectée par les réactifs du phosphore organique. Elle contient les sphingomyélines. La réaction à la ninhydrine positive peut signaler l'existence, à ce même niveau, de lysocomposés des céphalines, présence signalée à ce Rf par de nombreux auteurs.

La tache I de Rf 0,34 est colorée par les réactifs du phosphore et de la choline.

Cette fraction correspond aux lysolécithines.

En principe, la totalité de nos individualités lipidiques sont entraînées par le solvant d'élution. Nous avons, cependant, parfois noté la présence de coloration sur la piste de départ lorsque le dépôt avait été réalisé sous ventilation d'air chaud.

Cette fraction stationnaire correspond à des traces de lipides dont la structure a été modifiée par oxydation.

Il est possible, avec cette technique, de réaliser une séparation convenable des divers phospholipides en déposant directement 20 ml de sérum.

FIG. 8.

Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique. Fractionnement des phospholipides sériques. Migration sur 10 cm. Coloration : Rhodamine 6 G

C. CONCLUSION

Par chromatographie en couche mince et sur papier imprégné, nous avons pu mettre en évidence dans les extraits lipidiques totaux :

1. Parmi les lipides neutres :
   - — des stérides,
   - — des triglycérides,
   - — des acides gras libres,
   - — du cholestérol libre,
   - — des diglycérides et des monoglycérides.
2. Parmi les lipides phosphorés :
   - — des céphalines,
   - — des lécithines,
   - — des sphingomyélines et des lysocéphalines,
   - — des lysolécithines.

Les fractions obtenues après migration sur chromatoplaques ont pu être facilement éluées et soumises à une évaluation quantitative.

II. Lipides spléniques

Nous avons pratiqué l'extraction des lipides spléniques en traitant la pulpe par l'alcool à plusieurs reprises par des mélanges alcool-éther à concentration croissante en éther et enfin par l'éther.

Après évaporation de la liqueur éthéro-alcoolique et reprise par le chloroforme-méthanol (2-1), la purification selon Folch [62] était réalisée à + 4°C pendant une nuit.

Nous avons ainsi obtenu des taux de lipides totaux variant entre 27 et 30 g ‰.

A. LIPIDES NEUTRES

1° Chromatographie en couche mince

Après action du mélange solvant éther de pétrole-éther-acide-acétique (80-20-1) et coloration par l'acide phosphomolybdique nous avons décelé les individualités suivantes (figure 9) :

— La tache VII, en front, correspond aux stérides. Les réactions du cholestérol et des esters sont positives. Elle est nettement moins importante que celle obtenue dans les extraits sériques.

Le spot est d'ailleurs bien plus faible dans les rates animales (rat et bœuf) que dans les rates humaines.

— La tache VI migre avec un Rf voisin de 0,80. Elle renferme des triglycérides. Son importance est pratiquement identique pour tous les essais spléniques.

— La tache V correspond à la migration des acides gras libres. Elle est nettement séparée du spot suivant. Elle présente une intensité plus notable dans les extraits spléniques de rat.

Fig. 9.

Chromatoplaque. Fractionnement des lipides spléniques neutres. Coloration : acide phosphomolybdique.

1. Lipides spléniques de rat;
2. Mélange témoin (stérides, trioléine, acide oléique, cholestérol, phospholipides);
3. Lipides spléniques d'homme;
3. Homme;
4-5. Lipides spléniques de bœuf.

— La tache IV renferme le cholestérol comme le confirme la pulvérisation de solution d'acide silicotungstique ou de réactif de

Liebermann. Son intensité est pratiquement identique chez l'homme et les mammifères.

— La tache III indique la présence de diglycérides. Ceux-ci sont nettement visibles chez le rat.

Dans les extraits spléniques de bœuf ce spot est mal localisé et il existe une traînée diffuse jusqu'à la piste de départ.

— La tache II est assez nette chez le rat. Elle renferme une partie des monoglycérides.

— La tache I ne subit aucune migration. Elle est le témoin de la présence des lipides phosphorés, non entraînables par le mélange éther de pétrole-éther-acide acétique (80-20-1).

Par comparaison avec les lipides sériques, on peut mettre en évidence, une diminution assez marquée des stérides compensée par une augmentation des acides gras libres ainsi que des di et monoglycérides.

2° Comparaison avec le fractionnement sur papier imprégné d'acide silicique

Au moyen de la chromatographie sur papier nous avons pu déceler le même nombre de fractions.

B. PHOSPHOLIPIDES

1° Chromatographie en couche mince

On peut obtenir un bon fractionnement des individualités phosphorées sur chromatoplaque de Silicagel activé au moyen du mélange de solvants chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60-30-6-1). La migration simultanée d'un témoin de sérum permet de repérer avec plus de sureté l'emplacement des fractions. Il est également possible de juger de l'importance relative des divers composés.

Après détection par l'acide phosphomolybdique nous avons pu observer divers spots que nous allons envisager successivement (figure 10).

— Les taches VI et V, migrant en front, contiennent les graisses neutres.

— La tache IV, non dédoublée, renferme les céphalines. Son importance et son intensité contrastent beaucoup avec les deux spots séparés, obtenus après fractionnement des extraits sériques.

— La tache III migre avec un Rf assez constant et voisin de 0,5. Elle est due à l'existence de lécithine. Pour un dépôt de même quantité d'extrait lipidique elle paraît avoir même taille et même coloration que celles obtenues pour le sérum.

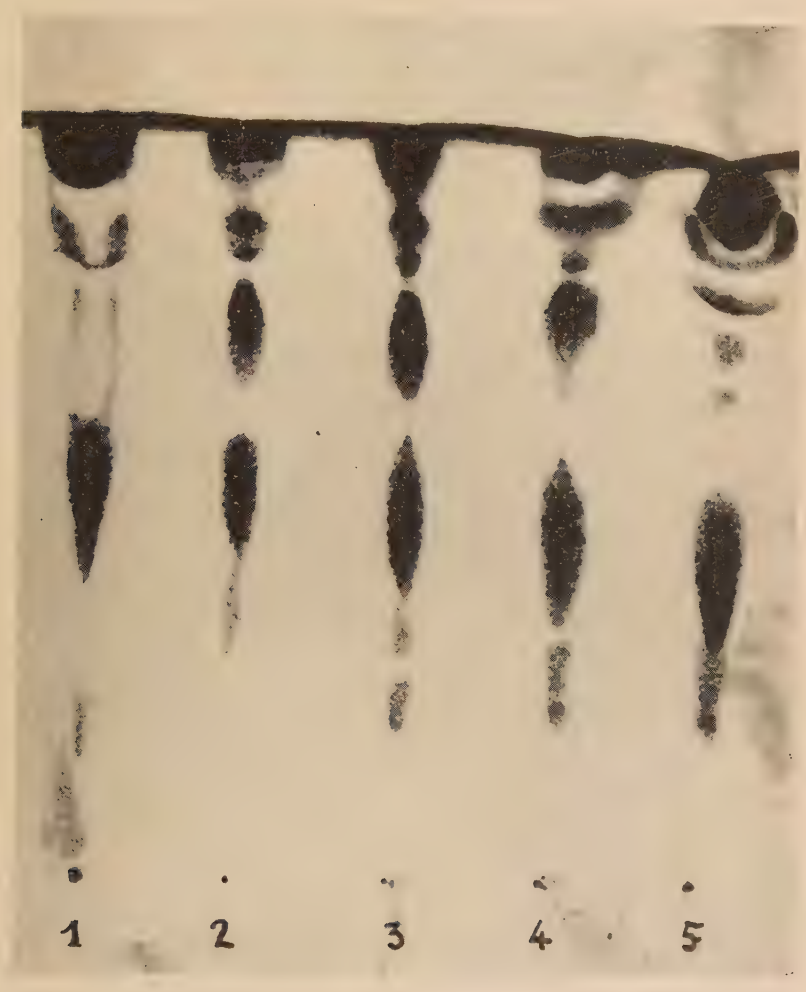


FIG. 10.

Chromatoplaque. Fractionnement des phospholipides. Coloration : acide phosphomolybdique.

1. Mélange témoin (lysolécithine, lécithine, céphaline, cholestérol);
2. Extrait splénique de bœuf;
3. Extrait splénique d'homme;
4. Extrait splénique de rat;
5. Extrait sérique.

— La tache II, assez bien séparée du spot des lécithines, se colore, en outre, par la ninhydrine. Elle renferme la sphingomyéline et la lysocéphaline. Ces deux phosphatides sont mieux séparés dans les extraits spléniques de rat où l'on peut distinguer à ce même emplacement la superposition de deux spots.

— La tache I, présente un Rf assez constant voisin de 0,3. Elle renferme les lysolécithines. Elle est présente dans les rates d'homme et de rat. Nous n'avons pas pu la mettre en évidence dans les rates de bœuf, fait déjà signalé par Gray [68].

2° Comparaison avec la séparation sur papier imprégné d'acide silicique

Le fractionnement d'extraits spléniques a également été réalisé sur papier imprégné d'acide silicique grâce au solvant diisobutyl-cétone-acide-acétique-eau (40-25-5).

Nous avons également déposé sur le papier des suspensions de pulpe splénique, soit dans du soluté physiologique à 9 g p. 1 000, soit dans une solution de KCl 0,15 M.

La séparation des phosphatides majeurs à partir de ces homogénats est réalisable d'emblée sur papier, et donne des résultats qui peuvent être comparés à ceux obtenus après extraction.

Les spots brunâtres sur la piste de départ et au niveau des lipides neutres sont dus à la présence de composés hémoglobiniques.

Nous avons pu déceler, après coloration à la rhodamine 6 G, les fractions suivante (figure 11) :

— La tache V contient la totalité des lipides neutres.

— La tache IV correspond à la présence des céphalines.

— La tache III est due à la migration des lécithines.

— La tache II renferme la sphingomyéline et la lysocéphaline.

— La tache I contient les lysolécithines.

Nous avons remarqué la disparition de ce spot au cours d'une lavage prolongé.

La fluorescence en lumière ultra-violette est atténuée par le séchage du papier. Elle est remplacée progressivement par une auréole de diffusion qui semble assez spécifique de ce composé.

III. Lipides du jaune d'œuf

La chromatographie en couche mince nous a permis d'obtenir également un certain nombre de résultats avec les lipides du jaune d'œuf.

Fig. 11.

Chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique. Fractionnement des phospholipides. Migration 40 cm. Coloration : Rhodamine 6 G.

1. Témoin de lysolécithine + sphingomyéline;
2. Extrait splénique total;
3 Suspension de rate de bœuf;
4 Suspension de rate humaine;
5 Sérum sans extraction préalable.

Ceux-ci, fractionnés par l'acétone qui précipite la plus grande partie mais non la totalité des phospholipides, sont redissous dans le mélange chloroforme-méthanol (2-1).

A. PHOSPHOLIPIDES

Le fractionnement de cet extrait et de l'extrait acétonique par le solvant chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60-30-6-1) fait apparaître quatre fractions correspondant aux phosphatides majeurs (figure 12).

Fig. 12.

Chromatoplaque. Fractionnement des phospholipides. Coloration : acide phosphomolybdique.

1. Témoin de cholestérol;
2. Extrait acétonique de jaune d'œuf;
3. Phospholipides extraits du jaune d'œuf;
4-5. Extrait sérique.

— La tache renfermant des céphalines est bien plus importante que dans le sérum.

— La tache III contient les lécithines.

— La tache II correspond aux sphingomyélines.

— La tache I correspond aux lysolécithines.

La proportion de ces diverses individualités phosphorées semble être identique dans chacun de ces deux extraits pour un même dépôt de phosphore.

B. LIPIDES NEUTRES

Ces deux extraits lipidiques ont également été étudiés par le solvant éther de pétrole-éther-acide acétique (80-20-1) (figure 13).

Dans la fraction acétonique nous n'avons pu déceler l'existence de stérides par aucune des réactions caractéristiques en notre possession.

La coloration à l'acide phosphomolybdique fait apparaître cinq spots distincts, renfermant dans l'ordre :

des triglycérides,
des acides gras libres,
du cholestérol libre,
des diglycérides,
des phospholipides.

Cette dernière tache est coiffée par un léger croissant dû à un début de migration des monoglycérides.

La fraction précipitée par l'acétone montre un spot sur la piste de départ, renfermant les phosphatides, et une tache très légère prouvant la persistance d'une faible quantité de cholestérol.

IV. **Expérimentation avec du ^{32}P**

A. CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Par chromatographie en couche mince nous avons cherché à mettre en évidence les diverses fractions phosphorées et à déceler l'importance de l'incorporation de l'élément radio actif dans chaque individualité.

L'extraction pratiquée sur des volumes de 1,9 à 3,5 ml de plasma, par le mélange chloroforme-méthanol (2-1) a donné des taux de lipides variant de 10 à 13,7 g ‰ de plasma. Vu la faible prise d'essai, nous n'avons pas pratiqué de purification selon Folch [62].

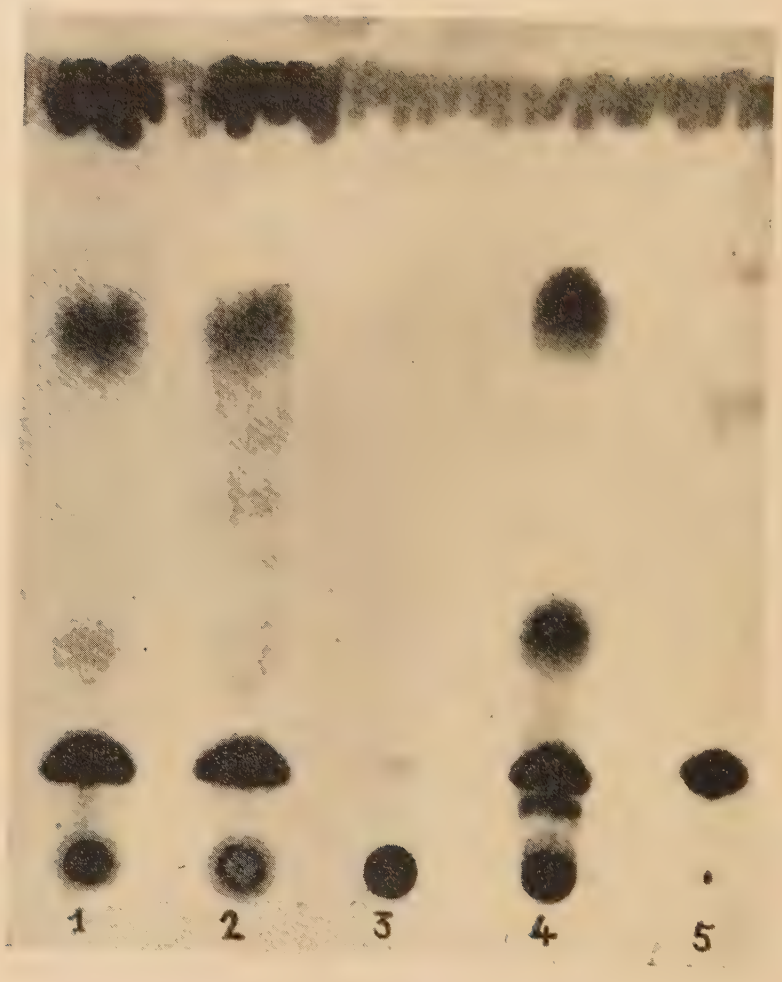


Fig. 13.

Chromatoplaque. Fractionnement des lipides neutres. Coloration : acide phosphomolybdique.

1-2. Extrait sérique.
3. « Phospholipides » du jaune d'œuf;
4. Fraction acétonique du jaune d'œuf;
5. Témoin de cholestérol libre.

Les organes prélevés pesaient de 0,8 à 1,5 g. L'extraction a été réalisée par 30 volumes de mélange chloroforme-méthanol-(2-1), puis la purification par la méthode de Folch a été effectuée pendant 12 heures à + 4°C. Nous avons obtenu des taux de lipides spléniques compris entre 30 à 38,7 g/ kg de pulpe.

Le système solvant éther de pétrole-éther-acide acétique (80-20-1) n'a entraîné aucun élément radio-actif, ce qui démontre sa spécificité pour les fractions hydrophobes.

Le mélange chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60-30-6-1) permet de mettre en évidence, sur des autoradiogrammes les composés suivants :

1° Dans le plasma (fig. 14)

On note la présence constante d'une traînée entre les divers spots, due vraisemblablement à la contamination de l'extrait par du ^{32}P minéral persistent dans l'extrait non purifié. Sur la piste

Fig. 14.

Chromatoplaque. Autoradiogramme. Incorporation de ^{32}P dans les phospholipides (P.L.) chez le rat.

1. P.L. plasmatiques après 3 h;
2. P.L. plasmatiques après 6 h;
3. P.L. plasmatiques après 9 h;
4. P.L. plasmatiques après 24 h;
5. P.L. spléniques après 24 h.

de départ, il persiste également une tache correspondant à l'existence d'élément radioactif. La coloration du phosphore organique, selon WADE et MORGAN [225] réalisée ultérieurement sur la chromatoplaque n'a décelé aucune de ces deux formations.

— Trois heures après l'injection, le radio élément est présent au niveau des céphalines, des lécithines et des lysolécithines avec un maximum d'intensité dans les lécithines.

— Six heures après l'injection, on note, en front, l'apparition d'une tache près de l'emplacement des graisses neutres, ainsi qu'un début d'incorporation dans les sphingomyélines. L'intensité des autres fractions s'est accrue, surtout au niveau des céphalines et des lysolécithines.

— Neuf heures après l'injection, l'augmentation de radio activité se manifeste à l'ensemble des fractions.

— Vingt-quatre heures après l'injection, nous pouvons déceler les individualités suivantes :

— La tache VII migre en dessous des lipides neutres. Elle renferme vraisemblablement les acides phosphatidiques;

— Les taches VI et V correspondent aux céphalines à colamine et à sérine. Le spot supérieur est assez important. Le spot inférieur, moins marqué, n'est pas décelé après pulvérisation d'acide phosphomolybdique sur la chromatoplaque;

— La tache IV, de dimensions et d'intensité très notables, renferme les lécithines;

— La tache III, révèle l'existence de sphingomyéline. L'intensité de la tache sur l'autoradiogramme est nettement plus faible que celle obtenue sur la chromatoplaque, après action d'un agent de détection classique;

— La tache II, correspond aux lysolécithines.

La fixation de radio élément au niveau de ce composé n'a cessé de croître avec le temps et semble être supérieure à celle obtenue sur les autres fractions.

— La tache I décèle la persistance de substance radioactive sur la piste de départ.

L'incorporation de ^{32}P dans les phospholipides plasmatiques est effective au bout de 3 heures sauf au niveau des sphingomyélines.

Après 24 heures, une fixation élective du radio élément paraît se faire au niveau des lysolécithines.

2° Dans la rate (fig. 15)

L'extrait splénique ayant été purifié selon Folch [62], par de l'eau distillée, les migrations ne présentent ni traînée, ni tache parasite au point de départ.

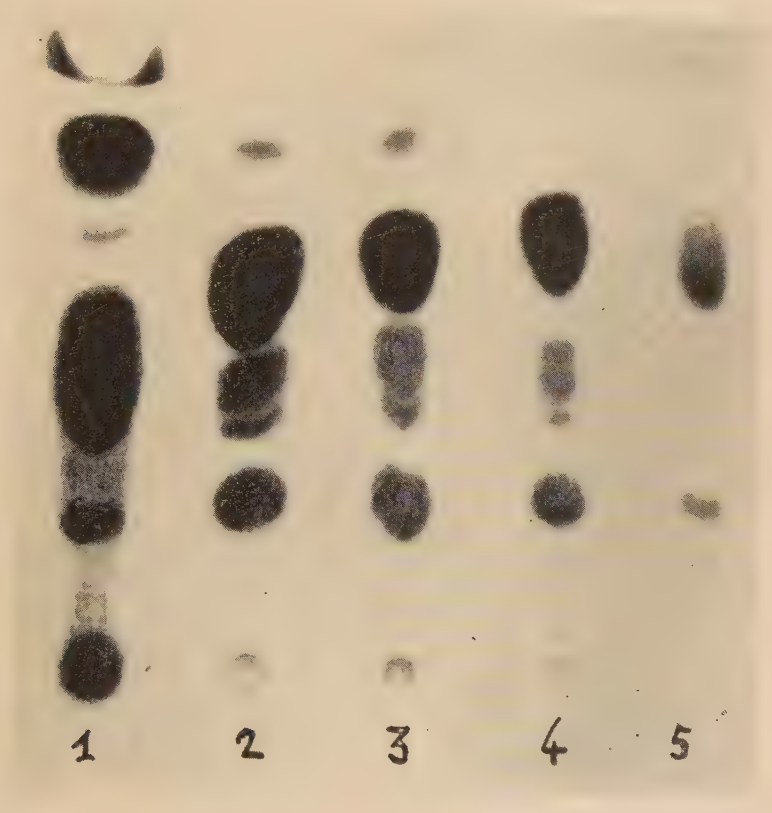


Fig. 15

Chromatoplaque. Autoradiogramme. Incorporation de ^{32}P dans les phospholipides chez le rat.

1. P.L. plasmatique après 24 h;
2. P.L. spléniques après 24 h;
3. P.L. spléniques après 9 h;
4. P.L. spléniques après 6 h;
5. P.L. spléniques après 3 h.

— Trois heures après l'injection, l'autoradiogramme révèle la présence de phosphore au niveau des lécithines et des lysolécithines. Les céphalines et les sphingomyélines sont à peine perceptibles.

— Six heures après l'injection, l'intensité des diverses fractions a augmenté notablement. Entre les lécithines et les lysolécithines, qui sont fortement imprégnées de radio élément, on note la présence de deux spots bien distincts.

Le plus important occupe la partie supérieure et renferme les sphingomyélines. Le spot inférieur, moins important, correspond à la présence de lysophosphatidyléthanolamine, signalée à ce même Rf par Paysant-Diamant et Polonowski [162] dans les hématies.

— Neuf heures après l'injection, les quatre fractions déjà signalées sont nettement visibles. Il s'y superpose une faible trace phosphorée correspondant aux céphalines.

— Vingt-quatre heures après, on note l'augmentation de l'intensité du spot renfermant les lysolécithines. L'incorporation du phosphore marqué au niveau de cette fraction est bien plus importante dans la rate que dans le plasma, ce qui semble être un argument en faveur de la biosynthèse splénique de ce phosphatide.

Le passage est très net, bien que l'extrait splénique ait été purifié par dialyse contre l'eau, et que les dépôts lipidiques de cet organe (400 μg) soient nettement plus faibles que ceux employés dans le plasma (500 à 700 μg).

L'emploi de radio élément nous a permis d'opérer des fractionnements meilleurs que ceux décelés par les colorants usuels (figure 16).

Nous avons pu mettre en évidence quelques aspects du métabolisme phospholipidique au niveau du plasma et du parenchyme splénique. Il nous a été également possible de nous assurer de l'insolubilité des fractions phosphorées (organiques ou même des substances minérales contaminantes) dans le système de solvants employé pour l'étude des lipides neutres.

FIG. 16.

Chromatoplaque. Phospholipides spléniques. Coloration aux vapeurs d'iode après autoradiogramme. Mêmes dépôts que dans fig. 15

B. COMPARAISON AVEC LES RÉSULTATS OBTENUS SUR PAPIER IMPRÉGNÉ D'ACIDE SILICIQUE

Quelques autoradiogrammes ont été obtenus, après fractionnement des extraits de lipides radioactifs par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique. Nous avons ainsi pu isoler, dans la rate, les quatre phosphatides majeurs (figure 17) et noter l'importance de l'incorporation de ^{32}P au niveau des lysolécithines.

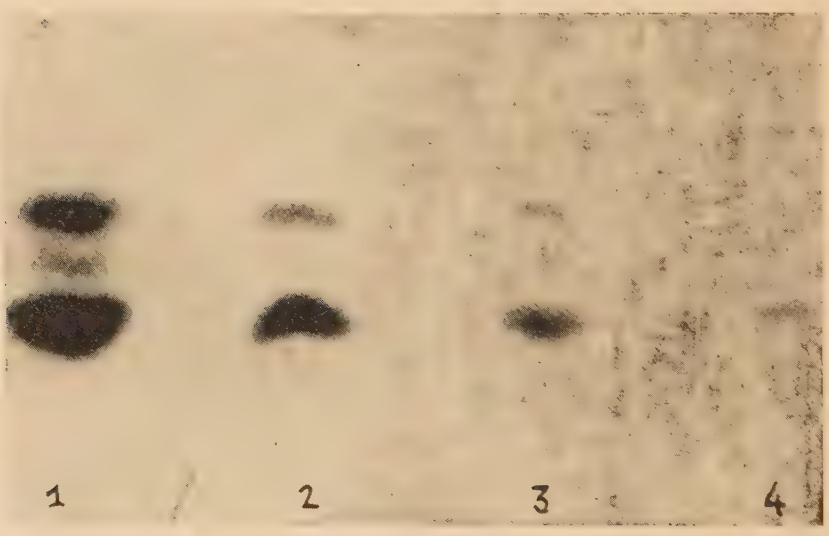


FIG. 17.

Fragment d'autoradiogramme obtenu après séparation des phospholipides spléniques de rat sur papier imprégné d'acide silicique. Migration sur 40 cm.

1. 24 h après injection de ^{32}P;
2. 9 h après injection de ^{32}P;
3. 6 h après injection de ^{32}P;
4. 3 h après injection de ^{32}P.

Les résultats sont moins bons que ceux obtenus sur plaque. La durée d'exposition des films est plus longue.

Il est néanmoins possible de noter l'importance de l'incorporation de ^{32}P au niveau des lysolécithines.

C. CONCLUSIONS

La chromatographie en couche mince est une méthode bien adaptée à l'analyse des lipides biologiques. Il convient, cependant, de savoir reconnaître ses possibilités et ses limites.

Les avantages les plus significatifs sur les méthodes déjà codifiées sont, à notre avis, les suivants :

— La simplicité : Il est infiniment plus aisé de préparer une chromatoplaque que d'imprégner convenablement d'acide silicique une feuille de papier.

— La rapidité : Des extraits lipidiques assez complexes peuvent être fractionnés en moins d'une heure. La même opération demande plusieurs heures ou quelques jours si on utilise les techniques sur papier ou sur colonne.

— L'efficacité : Les spots obtenus sur chromatoplaques sont mieux délimités que ceux obtenus sur papier. Les techniques de détection peuvent faire appel à une gamme de réactifs plus complète que celle employée dans les autres méthodes de fractionnements.

— La capacité de la couche à adsorber les lipides étant plus importante, il est possible d'obtenir des séparations dans un but préparatif ou quantitatif.

— L'emploi de radio-isotopes sensibilise la méthode et lui confère une plus grande spécificité.

Cependant, il convient d'insister sur le fait que les Rf sont moins reproductibles que sur papier imprégné d'acide silicique, même lorsque l'on s'entoure du maximum de précautions.

On peut remédier à cet inconvénient en réalisant la migration simultanée de substances témoins ou en utilisant un faisceau de réactions spécifiques.

Le Président de Thèse :

P. VALDIGUIÉ.

VU, le Doyen :

LAZORTHES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER.

Toulouse, le 28 juin 1963.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :

P. DOTTIN.

Bibliographie

[1] Abelson D. — Ultraviolet photography of fluorescent spots on chromatograms of biological extracts. *Nature,* 1960, **188,** 850-851.

[2] Adamec O., Matis J., Galvanek M. — Chromatographic separation of corticoid on a thin layer of silicagel. *Lancet,* 1962, **1,** 81-82.

[3] Agneray J., Puiseux F. et Wepierre J. — Microdosage du cholestérol libre et du cholestérol estérifié. *Ann. Biol. Clin.,* 1959, **17,** 178-185.

[4] Akhrem AA., Kuznecova AI. — Utilisation de la chromatographie en couche mince pour la séparation des stéroïdes (en russe). *Med. Promyshl. S.S.S.R.,* 1961, **15,** n° 2, 57-62; *Bull. Sign. C.N.R.S.* 1961, **22,** 11-12.

[5] Akhrem AA., Kuznecova AI., Titov Y.U., Levina I.S. — Separation of acetylenic alcohols and glycols by means of thin layer chromatography on aluminium oxide. *Izv. Akad. Nauk. S.S.S.R. Otd Nauk.,* 1962, **143,** 657-661; C.A., 1962, **57,** 4003.

[6] Anet E.F.L.J. — Thin layer chromatography of 2-4 dinitrophenylhidrazine derivatives of hydroxycarbonyl compounds. *J. Chromatog.,* 1962, **9,** 291-294.

[7] Arx E. von, Neher R. — Einrichtung Eines labors für Papier- und Dünnschicht-chromatographie. *J. Chromatog.,* 1962, **8,** 145-156.

[8] Avigan J., Goodman D.S., Steinberg D. — Thin layer chromatography of sterols and steroids. *J. Lipid Research,* 1963, **4,** 100-101.

[9] Ayrault-Jarrier M. — Action des détergents sur une β-lipoprotéine isolée du sérum humain. *Thèse Sciences,* Paris, 1959.

[10] Bailey G.F. — Instrument for measurement of fluorescence of paper chromatographic spots. *Anal. Chem.,* 1960, **32,** 1726-1727.

[11] Barbier M., Jager H., Tobias H., Wyss E. — Anwendung der Dünnschicht-chromatographie auf Steroide. *Helv. Chim. Acta.,* 1959, **42,** 2440-2446.

[12] Barrett G.C. — Iodine as a « non destructive » colour reagent in paper and thin layer chromatography. *Nature,* 1962, **194,** 1171-1172.

[13] Barrett C.B., Dallas M.S.J., Padley F.B. — The separation of glycerides by thin layer chromatography on silica impregnated with silver nitrate. *Chem. and Ind.* (London), 1962, 1050-1051.

[13 *bis*] Bauer F. et Hirsch E. — A new method for the colorimetric determination of the esterified fatty acids in human sera. *Arch. of Biochem.*, 1949, **20**, 242-250.

[14] Bekersky I. — Spray technique for the preparation of thin layer chromatography plates. *Anal. Chem.*, 1963, **35**, 261-262.

[15] Bennett R.D. et Heftmann E. — Thin layer chromatography of corticosteroids. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 348-352.

[16] Bennett R.D. et Heftmann E. — Thin layer thromatography of sterols. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 359-362.

[17] Biezenski J.J. — A simple chromatographie technique for removal of non lipid contaminants from lipid extracts. *J. Lipid Research*, 1962, **3**, 120-125.

[18] Birkofer L., Kaiser C., Meyer-Stoll H. et Suppan F. — Dünnschicht Chromatographie an Polyacrylnitril-Perlon. *Z. Naturforsch.*, 1962, **17 b**, 352-360.

[19] Bloor W. — A method for the determination of fat in small amount of blood. *J. Biol. Chem.*, 1914, **17**, 377-384.

[20] Bloor W. — A method for the determination of « lecithin » in small amount of blood. *J. Biol. Chem.*, 1915, **22**, 133-140.

[21] Braun D. et Geenen P. — Dünnschicht-chromatographie von carbonsäuren. *J. Chromatog.*, 1962, **7**, 56-59.

[22] Brenner M. et Niederwieser A. — Durchlaufende Dünnschichtchromatographie. *Experientia*, 1961, **17**, 237-238.

[23] Brockerhoff H. — Breakdown of phospholipids in mild alkaline hydrolysis. *J. Lipid Research*, 1963, **4**, 96-99.

[24] Brockmann H. — Trennung farbloser Substanzen mit Hilfe der chromatographischen Adsorptions method. *Angew. Chem.*, 1947, **A 59**, 199-206.

[25] Brockmann H. et Schodder H. — Aluminium oxide mit abgestuftem Adsorptions vermögen zur chromatograph. Adsorption. *Ber. deut. Chem. Ges.*, 1941, **74 B**, 73-78.

[26] Brockmann H. et Volpers F. — Zur Kenntnis der chromatographischen Adsorption. — 4. Mitt. Trennung farbloser Stoffe an fluorescierenden Adsorbeutien. *Chem. Ber.*, 1949, **82**, 95-104.

[27] Brown F. — Separation of fatty acids as anions by paper chromatography. *Biochem. J.*, 1950, **47**, 598-600.

[28] Brown F. et Hall J.P. — The separation of carboxylated ions on the paper chromatogram. *Nature*, 1950, **166**, 66-67.

[29] Brown J.L., Johnston J.M. — Radio assay of lipid components separated by thin layer chromatography. *J. Lipid Research*, 1962, **3**, 480-481.

[30] Bryant L.H. — Circular chromatography of terpenes on adsorbent coated glass. *Nature*, 1955, **175**, 556-560.

[31] Cerny V., Joska J. et Labler L. — Steroids LIX. Application of TLC without binder for rapid analytical and preparative separation of steroids. Collection *Czechoslov. Chem. Communs.*, 1961, **26**, 1658-1668; C.A., 1961, **57**, 12 971.

[32] Cerri O., Maffi G. — Thin layer chromatography. *Boll. Chim. Farm.*, 1961, **100**, 940-950; C.A., 1961, **57**, 11 467

[33] Cerri O., Maffi G. — Thin layer chromatography. Identification and separation of testosterone derivates. *Boll. Chim.*, 1961, **100**, 954-955; C.A., 1961, 57, 11 467.

[34] Chargaff E., Levine C. et Green C. — Technique for the demonstration by chromatography of nitrogenous lipid constituents of fur containing aminoacids and reducing sugars. *J. Biol. Chem.*, 1948, **175**, 67-71.

[35] Circo R., Freeman B.A. — Diethylamine-Ninhydrine as a color test Aid in identification of amino acids on paper chromatograms. *Anal. Chem.*, 1963, **35**, 262-263.

[36] Clement J., Di Costanzo G. — Separation chromatographique. identification et analyse des phospholipides de la muqueuse intestinale du rat à jeun. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, **45**, 127-134.

[37] Consden R., Gordon A.H. et Martin A.J.P. — Qualitative analysis of Proteins : A partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.*, 1944, **38**, 224-228.

[38] Dain J.A., Weicker H., Schmidt G. et Thannhauser S.J. — The fractionation of beef brain ganglioside into several components with thin layer and column silicagel chromatography, p. 289 *in* Cerebral Sphingolipidoses. Academic Press. Ed., New York. Londres, 1962.

[39] Davidek J. — Separation of gallic acid and its esters on thin layers of polyamide powder. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 302-305.

[40] Davidek J., Blattna J. — Chromatography of fat soluble vitamins on thin layers of alumina. *J. Chromatog.*, 1962, **7**, 204-210.

[41] Davidek J., Davidkova E. — Polyamid-Dünnschichtchromatographie. *Pharmazie*, 1961, **16**, 352.

[42] Davidek J., Pokorny J. — Nachweiss von Antioxydantien in Fetten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Polyamidpulver. *Z. Lebensm. Untersuch. V. Forsch.*, 1961, **115**, 113-117.

[43] Davidek J., Pokorny J., Janicek G. — Nachweiss und Bestimmung von Lebensmittelfarbstoffen mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Aluminium oxide. *Z. Lebensm. Untersuch. U. Forsch.*, 1961, **116**, 13-19.

[44] Davidek J. et Prochazka Z. — Thinlayer chromatography on polyamide powder. Collection Czechoslov. *Chem. Commun.*, 1961, **26,** 2947.

[45] Davison A.N., Graham-Wolfaard E. — Quantitative analysis of lipids by thin layer chromatography. Proceedings of the Biochemical Society. *Biochem. J.*, 1963, **87,** 31 p.

[46] Deferrari J.O., Muchnik de Lederkremer R., Matsuhiro B., Sproviero J.F. — Thin layer chromatography of acyl derivates of sugars. *J. Chromatog.*, 1962, **9,** 283-290.

[47] Delsal J.L. et Manhouri H. — Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode d'une haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, **37,** 1041-1054.

[48] Demole E. — Sur la présence d'isophytol dans l'essence absolue de Jasmin. *Compt. Rend.*, 1956, **243,** 1833-1835.

[49] Demole E. — Application de la microchromatographie d'adsorption sur couche mince. *J. Chromatog.*, 1958, **1,** 24-34.

[50] Demole E. — Progrès récents de la microchromatographie sur couches minces. *J. Chromatog.*, 1961, **6,** 2-21.

[51] Dhopeshwarkar G.A. et Mead J.F. — Metabolism of methyl elaidate. *J. Lipid Research,* 1962, **3,** 238-242.

[52] Di Costanzo G. et Clément J. — Composition en acides gras des divers phospholipides de la muqueuse intestinale du rat à jeun et en période d'adsorption. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, **45,** 137-144.

[53] Duncan G. — The transfer of chromatoplate resolution to large scale preparations on adsorption columns. A new apparatus for producing thin layer. *J. Chromatog.*, 1962, **8,** 37-43.

[54] Egger K. — Dünnschicht-chromatographie von Anthocyanen. *Planta,* 1962, **58,** 664-667.

[55] Eisenberg F. — Rapid method for permanent recording of thin layer chromatograms. *J. Chromatog.*, 1962, **9,** 390-391.

[56] Ertel H., Horner L. — Zwei universal Reagentum zur Dünnschicht-chromatographie. *J. Chromatog.*, 1962, **7,** 268.

[57] Feigl F. — Spot tests in Organic analysis. 5 th ED. Elsevier, Amsterdam, 1956, p. 237.

[58] Filimonov V.N. — The study of the reaction of molecules with the surface of aluminosilicagel and silicagel by the method of infrared adsorption spectra. *Optika i Spectroskopia* (Leningrad), 1956, **1,** 490-499; C.A., 1957, **51,** 6 271.

[59] Fillerup D.L., Mead J.F. — Chromatographic separation of the plasma lipids. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 1953, **883,** 574-577.

[60] Fleury P., Courtois J.E., Malangeau P. — Sur l'emploi de la chromatographie sur papier pour la séparation du mésoinositol d'avec le scillitol et leur caractérisation. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, **35**, 537-540.

[61] Folch J., Ascoli I., Lees M., Meath J.A. et Le Baron F.N. — Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.*, 1951, **191**, 833-841.

[62] Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.M. — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, **226**, 497-509.

[63] Folch J. et van Slyke D. — Preparation of blood lipid extracts free from non-lipid extractives. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1939, **41**, 514-520.

[64] Folch J. et van Slyke D. — Nitrogenous contaminants in petroleum ether extracts of plasma lipids. *J. Biol. Chem.*, 1939, **129**, 539-545.

[65] Gatt S. et Berman E.R. — Studies on brain lipids in Tay-Sachs disease. I. Isolation of two sialic acid free glycolipids. *J. of Neurochemistry*, 1963, **10**, 43-49.

[66] Getz H.R., Lawson D.D. — A method for the preparation of permanent record of thin layer chromatoplates. *J. Chromatog.*, 1962, **7**, 266.

[67] Gjone E., Berry J.F. et Turner D.A. — The isolation and identification of lysolecithin from lipid extracts of normal human serum. *J. Lipid Research*, 1959, **1**, 66-71.

[68] Gray G.M. — The phospholipides of ox spleen with special reference to the fatty acid and fatty aldehyde composition of the lecithin and kephalin fraction. *Biochem. J.*, 1960, **77**, 82-91.

[69] Griffith J.Q. et Jeffers W.A. — The circulatory system in the Rat in Laboratory investigation. Griffith J.Q. et Farris E.J., J.B. Lippincott Company Editeur Philadelphia, Montreal, London, 1942.

[70] Gritter R.J. et Albers R.J. — Non destructive zone developing in thin layer chromatography. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 393-395.

[71] Grossman C.M., Mac Ewan A.M. — Preservation and photography of Rhodamine 6 G stained lipid spots. *J. Lipid Research*, 1960, **1**, 488-489.

[72] Grüner S. et Spaich W. — Trennung von Arnica-Montana Tincktüren. *Arch. Pharm.*, 1954, **287**, 243-249.

[73] Habermann E., Bandtlow G., Krusche B. — Bestimmung von Plasma-phospholipoiden nach Dünnschichtchromatographie. *Klin. Woch.*, 1961, **39**, 816-817.

[74] Hack M.H. — Analysis of lipids by spot tests on filter paper disk chromatogram. *Biochem. J.*, 1953, **54**, 602-605.

[75] Hanahan D.J., Turner M.B. et Jayko M.E. — The isolation of egg phosphatidyl choline by an adsorption column technique. *J. Biol. Chem.*, 1951, **192,** 623-628.

[76] Hanes C.S. et Isherwood F.A. — Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatograms. *Nature,* 1949, **164,** 1107-1112.

[77] Hernandez R., Hernandez R. jr et Axelrod L.R. — Activation proceeding and standardisation from silicic acid preparations. *Anal. Chem.*, 1961, **33,** 370-373.

[78] Hewitt L.H. — Optical rotary power and dispersion of proteins. *Biochem. J.*, 1927, **21,** 216-224.

[79] Hilton J., Hall W.B. — Recording thin layer chromatographic data. *J. Chromatog.*, 1962, **7,** 266-267.

[80] Hirsch J. et Ahrens E.H. — The separation of complex lipid mixtures by the use of silicic acid chromatography. *Biochem. Chem.*, 1958, **233,** 311-318.

[81] Hofmann A.F. — Thin layer adsorption chromatography on microscope slides. *Anal. Biochem.*, 1962, **3,** 145-149.

[82] Hofmann A.F. — Separation of 1-and 2-monoglycerides by a thin layer adsorption chromatography on hydroxylapatite. *J. Lipid Research,* 1962, **3,** 391-393.

[83] Honegger C.G. — Dünnschicht-Ionophorese und Dünnschicht-Ionophorese Chromatographie. *Helv. Chim. Acta,* 1961, **44,** 173-179.

[84] Honegger C.G. — Uber die Dünnschicht-chromatographie von Lipiden-2-Mitteilung Untersuchung von Gehirngewebe aus der Weissen substanz multiple Sclerose Kranter. *Helv. Chim. Acta,* 1962, **45,** 2020-1029.

[85] Hunhstock K., Weicker H. — Untersuchungen über quantitative Serum lipidbestimmungen mit der Dünnschichtchromatographie. *Klin. Woch.*, 1960, **38,** 1249-1250.

[86] Huneck S. — Zur struktur von Zeorin und Leucotylin. *Chem. Ber.*, 1961, **94,** 614-622.

[87] Huneck S. — Notiz über das Epizeorin. *Chem. Ber.*, 1961, **94,** 1151-1153.

[88] Huneck S. — Triterpene. III. Die Anwendung von Gewachsenem Aluminiumoxyd als Selbsttragendes adsorbens in der Dünnschichtchromatographie von Triterpenen. *J. Chromatog.*, 1962, **7,** 561-564.

[89] Izmailov N.A., Shraïber M.S. — A drop chromatographic method of analysis and its utilisation in pharmacy I (en russe). *Farmatsiya,* 1938, **3,** 1-7; C.A., 1940, **34,** 855.

[89 *bis*] Jarrier M., Polonovski J. — Méthode de dosage des acides gras estérifiés et son application au sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, **37,** 495-499.

[90] Jatzkewitz H. — Zür Dünnschicht Chromatographie der Gehirn Lipoide. *Z. Physiol. Chem.*, 1960, **320**, 134-148.

[91] Jatzkewitz H. — Eine neue Methode zur quantitativen Ultramikrobestimmung der Sphingolipoide aus Gehirn. *Z. Physiol. Chem.*, 1961, **326**, 61-64.

[92] Jatzkewitz H. et Mehl F. — Zur Dünnschicht chromatographie der Gehirn Lipoide uhrer um- and Abbau produkte. *Z. Physiol. Chem.*, 1960, **320**, 251-257.

[93] Kaufmann H.P. et Das B. — Die Dünnschicht chromatographie auf dem Fettgebiet : VIII. Triglycerides. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1962, **64**, 214-217.

[94] Kaufmann H.P. et Khoe Th. — Die Dünnschicht chromatographie auf dem Fettgebiet : VII. Trennung von Triglycerides. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1962, **64**, 81-85.

[95] Kaufmann H.P. et Ko Y.S. — Die Dünnschicht chromatographie. Trennung von Hydroxycetonsaüren und Lactonen. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, **63**, 828-830.

[96] Kaufmann H.P. et Makus Z. — Die Dünnschicht chromatographie auf dem Fettgebiet I : Trennung von model Mischungen. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1960, **62**, 1014-1020.

[97] Kaufmann H.P. et Makus Z. — Die Dünnschicht-chromatographie auf dem Fettgebiet : II. Trennung von Cholesterol Estern. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, **63**, 235-239.

[98] Kaufmann H.P., Makus Z. et Das B. — Die Dünnschicht-chromatographie auf dem Fettgebiet IV. Trennung von Triglyceride. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, **63**, 807-811.

[99] Kaufmann H.P., Makus Z. et Deicke F. — Die Dünnschicht-chromatographie auf dem Fettgebiet : II. Trennung von Cholesterol Fettsaüre Estern. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, **63**, 294-298.

[100] Kaufmann H.P., Makus Z. et Khoe Th. — Die Dünnschicht-chromatographie auf dem Fettgebiet : III. Uber die Schichtbarmachung der zu Analysierenden Stoffe auf der platte. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, **63**, 689-691.

[101] Kirchner J.G. et Keller G.J. — Chromatography on treated filter paper. *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 1867-8.

[102] Kirchner J.G. et Miller J.M. — Preparation of oils without terpenes. A Chromatographic system. *Ind. Eng. Chem.*, 1952, **44**, 318.

[103] Kirchner J.G. et Miller J.M. — Constituents of volatil oils in pineapple juice. *J. Agr. Food Chem.*, 1953, **1**, 512-518.

[104] Kirchner J.G. et Miller J.M. — Volatile water soluble and oil constituents of Valencia orange juice. *J. Agr. Food Chem.*, 1957, **5**, 283-291.

[105] Kirchner J.G., Miller J.M. et Keller G.J. — Separation and identification of some terpenes by a new chromatographic technique. *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 420-425.

[106] Kirchner J.G., Miller J.M. et Rice R.G. — Quantitative determination of biphenyl in lemon and fruit by chromatostrips. *J. Agr. Food Chem.*, 1954, **2**, 1031.

[107] Klein P.D. — Silica gel structure and the chromatographic process. Surface energy and activation procedures. *Anal. Chem.*, 1962, **34**, 733-736.

[108] Klenk E. et Gielen W. — Dünnschicht chromatographische Trennung von Ganglioside Gemischen. *Z. Physiol Chem.*, 1961, **323**, 126-130.

[109] Knight H.S. et Groennings S. — Indicator chromatographic analysis of organic mixtures. *Anal. Chem.*, 1954, **26**, 1549-53.

[110] Kochetkov N.K., Zhukuva I.G. et Glukhoded I.S. — Thin layer chromatography of cerebrosides (en russe). *Doklady, Akad. Nauk S.S.S.R.*, 1961, **139**, 608-611; C.A., 1961, **55**, 27 507.

[111] Kuhn R., Wiegandt H. et Egge H. — Weitgehend Strucktur für Gangliosiden. *Angew. Chem.*, 1961, **73**, 580-581.

[112] Lea C.H. et Rhodes D.N. — Partition chromatography of egg-yold phospholipids on cellulose. *Biochem. J.*, 1953, **54**, 467-469.

[113] Lea C.H., Rhodes D.N. et Stoll R. — Phospholipids. 3. On the chromatographic separation of glycerophospholipids. *Biochem. J.*, 1955, **60**, 353-363.

[114] Lees T.M. et de Muria P.J. — A simple method for the preparation of thin layer chromatography plates. *J. Chromatog.*, 1962, **8**, 108-109.

[115] Lennartz H.J. — Zur Reihe der Losüngsmittel fur die chromatographische Adsorption Analyse. *Angew. Chem.*, 1947, **A 59**, 158-159.

[116] Levine C., Chargaff E. — Procedure for the microestimation of nitrogenous phospholipids constituents. *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 465.

[117] Lichtenberger W. — Konservierung Dünnschicht-chromatographie wird der Polyvinyl filme. *Z. Anal. Chem.*, 1962, **185**, 111-112.

[118] Lie K.B. et Nyc J.F. — The chromatography of lipids in test tubes coated with a thin layer of silicic acid. *J. Chromatog.*, 1962, **8**, 75-81.

[119] Liebermann C. — Über das Oxy-chinoterpen. *Beritche*, 1885, **18**, 1803-1809.

[120] Mac Donald R.S. — Study of the interaction between hydroxyl groups of aerosil silica and adsorbed non polar molecules by infrared spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 850-854.

[121] Machebœuf M. — Etat des lipides de la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique. Paris, 1937, Hermann Ed.

[122] Malins D.C. — Fatty acids and glycerol ethers in alkoxydiglycerides of dog fish liver oil. *Chem. et Ind.* (London), 1960, 1359-1360.

[123] Malins D.C. et Mangold H.K. — Analysis of complex lipid mixtures by TLC and complementary methods. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1960, **37**, 576-578.

[124] Mangold H.K. — Zur Analyse von Lipiden mit Hilfe der Radioreagens - Methode. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1959, **61**, 877-881.

[125] Mangold H.K. — Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chemists' Society*, 1961, **38**, 708-727.

[126] Mangold H.K. et Kammereck R. — Separation, identification and quantitative analysis of fatty acids by TLC and GLC. *Chem. and Ind.* (London), **1961**, 1032-1034.

[127] Mangold H.K. et Kammereck R. — Analyzing industrial aliphatic lipids. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1962, **39**, 201-206.

[128] Mangold H.K., Kammereck R. et Malins D.C. — Proceedings 1961 International Symposium on Microchemical techniques, *in* Dünnschicht-chromatographie Ein Laboratoriumshandbuch Springer Verlag Berlin. Gottingen. Heidelberg, 1962, p. 154.

[129] Mangold H.K., Lamp B.G. et Schlenk H. — Indicators for the paper chromatography of lipids. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 6070-6072.

[130] Mangold H.K. et Malins D.C. — Fractionation of Fats, Oils and Waxes on TL of silicic acid. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1960, **37**, 383-385.

[131] Mangold H.K. et Tuna N. — Analysis of tissue lipids by TLC and GLC. *Federation Proc.*, 1961, **20**, 268.

[132] Marinetti (G.V.). — Chromatographic separation, identification and analysis of phosphatides. *J. Lipid Research*, 1962, **3**, 1-20.

[133] Marinetti G.V., Albrecht M., Ford T. et Stotz E. — Analysis of human plasma phosphatides by paper chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **36**, 4-14.

[134] Marinetti G.V., Erbland J., Albrecht M. et Stotz E. — The application of chromatographic methods to study of incorporation of ^{32}P labelled orthophosphate into the phosphatides of rat liver homogenates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **25**, 585-591.

[135] Marinetti G.V., Erbland J., Albrecht M. et Stotz E. — Time study of incorporation in vivo of ^{32}P orthophosphate into phosphatides of rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, **30**, 543-548.

[136] Marinetti G.V., Kochen J., Erbland J. et Stotz E. — Lipid composition of purified cytochrome preparation of pig heart. *J. Biol. Chem.*, 1957, **229**, 1027-1035.

[137] Marinetti G.V. et Stotz E. — Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, **21**, 168-170.

[138] Marinetti G.V. et Stotz E. — Direct chromatography of serum lipids without solvent extraction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **37**, 571-573.

[139] Martin A.J.P. et Synge R.L.M. — A new chromatographic system using two liquid phases. *Biochem. J.*, 1941, **35**, 1358.

[140] Meinhard J.E. et Hall N.F. — Surface chromatography. *Anal. Chem.*, 1949, **21**, 185-188.

[141] Meinhard J.E. et Hall N.F. — Surface chromatography. Refinements in apparatus and technique. *Anal. Chem.*, 1950, **22**, 344-351.

[142] Michaelec C. — Thin layer chromatography with binder. *Chem. listy* (Prague), 1961, **55**, 953-973; C.A., 1961, **55**, 26 823.

[143] Michaelec C., Sulc M., Mestan J. — Analysis of cholesteryl esters and triglycerides by thin layer chromatography. *Nature*, 1962, **193**, 63-64.

[144] Michaelec C., Sulc M., Mestan J., Halama D., Koman V. — Lipids in some pathological states. II. Cholesterol esters in human blood serum and in some animal species. *Sbornik. Le Karsky.*, 1961, **63**, 99-103; C.A., 1962, **56**, 3 949.

[145] Miller J.M. et Kirchner J.G. — Isolation of some terpenes and oxyterpen in essential oils. *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 428-432.

[146] Miller J.M. et Kirchner J.G. — Some improvements in chromatographic technique for Terpenes. *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 1480.

[147] Miller J.M. et Kirchner J.G. — Chromatostrip for identifying constituents of Essentiel Oils. *Anal. Chem.*, 1953, **25**, 1107.

[148] Miller J.M. et Kirchner J.G. — Apparatus for the rapid coating of chromatostrips. *Anal. Chem.*, 1954, **26**, 2002.

[149] Mistryukov E.A. — Chromatography on plates with no bound aluminium oxide. Collection Czechoslov. *Chem. Communs*, 1961, **26**, 2071-2073; C.A., 1962, **56**, 2 867.

[150] Mistryukov E.A. — Thin layer chromatography using the descending technique with no bound alumina plates. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 311-315.

[151] Mistryukov E.A. — Thin layer chromatography of some strongly adsorbed amines on no bound alumina plates. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 314-315.

[152] Morris L.J., Holmann R.T., Fontell K. — Naturally occuring epoxy acids : I. Detection and evaluation of epoxy fatty acids by paper, thinlayer and gaz-liquid chromatography. *J. Lipid Research*, 1961, **2**, 68-76.

[153] Mottier M. — Über die Extraktion und Chromatographie auf aluminium oxide von Farbstoffen. *Mitt. Gebiete Lebensm. U. Hyg.*, 1956, **47**, 372-386.

[154] Mottier M. et Potterat M. — Über die Extraktion von Lebensmittel Farbstoffen mit Chinolin und ihrem Nachweiss durch Chromatographie auf Tonerde plateen. *Anal. Chim. Acta,* 1955, **13,** 46-56.

[155] Müldner H.G., Wherrett J.R. et Cumings J.N. — Some applications of thin layer chromatography in the study of cerebral lipids. *J. Neurochemistry,* 1962, **9,** 607-611.

[156] Mutter K. et Hofstetter J.F. — In. Thin layer chromatography of lipids. — Mangold H.K., *J. Am. Oil Chem. Soc.,* 1961, **38,** 708-727.

[157] Newman H.A., Ching-Tong-Liu, Zilversmitt D.B. — Evidence for the physiological occurence of lysolecithin in Rat plasma. *J. Lipid Research,* 1961, **2,** 403-411.

[158] Paysant-Diament M., Budon S. et Polonovski J. — Incorporation ^{32}P dans les phospholipides plasmatiques et globulaires du sang du rat *in vivo.* In *The Enzymes of lipid Metabolism,* p. 250. Pergamon Press. London, 1961.

[159] Paysant M., Bursztein Cl., Maupin B. et Polonovski J. — Métabolisme phospholipidique du sang. IV. Incorporation *in vitro* du ^{32}P dans les phospholipides plaquettaires du sang humain. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1962, **44,** 477-488.

[160] Paysant M., Bursztein Cl., Maupin B. et Polonovski J. — Métabolisme phospholipidique du sang. V. Incorporation *in vitro* du ^{32}P Phosphate dans les Phospholipides leucocytaires du sang humain. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1962, **44,** 489-500.

[161] Paysant M., Maupin B., Polonovski J. — Métabolisme phospholipidique du sang. VII. Incorporation *in vitro* du ^{32}P Phosphate dans les phospholipides des hématies du sang humain. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1963, **45,** 247-252.

[162] Paysant-Diament M. et Polonovski J. — Incorporation *in vitro* du ^{32}P dans les phospholipides globulaires du sang humain. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1960, **42,** 337-350.

[163] Peereboom J.W.C. et Beekes H.W. — The analysis of mixtures of animal and vegetables fats. III. Separation of some sterol and sterol acetate by thin layer chromatography. *J. Chromatog.,* 1962, **9,** 316-320.

[164] Peifer J.J. — Dünnschicht-chromatographische Analyse bei Mikrochromatoschichten. *Mikrochim. Acta,* 1962, 529-540.

[165] Pitra J. — Use of silica gel in chromatography. *Chem. Listy,* 1962, **56,** 495-504; C.A., 1962, **57,** 5 279.

[166] Polonovski J., Etienne J., Paysant J. et Petit M. — Fractionnement chromatographique des phospholipides plasmatiques. *Ann. Biol. Clin.,* 1959, **17,** 186-192.

[167] Polonovski J., Paysant M., Wald R. — Incorporation de phosphate et de glucose marqués dans les lipides spléniques du rat. *Bull. Soc. Chim. Biol.,* 1962, **44,** 309-325.

[168] Privet O.S. et Blank M.L. — A new method for the analysis of component mono, di, and triglycerides. *J. Lipid Research,* 1961, **2,** 37-44.

[169] Privett O.S., Blank M.L. et Lundberg W.D. — Determination of mono-, di- and triglycerides by molecular distillation and thin layer chromatography. *J. Am. Oil Chemists' Society,* 1961, **38,** 312-316.

[170] Privett O.S. et Nickell E.G. — Stereoisomer formation on the ozonisation of esters of mono-unsaturated fatty acids. *J. Lipid Research,* 1963, **4,** 208-211.

[171] Privett O.S. et Nickell S. — Determination of structure of triglycerides via reductive ozonolysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.,* 1962, **39,** 314-318.

[172] Prochazka Z. — Thin layer chromatography without a binding agent. *Chem. Listy,* 1961, **55,** 974-982; C.A., 1961, **55,** 26 823.

[173] Randerath K. — Dünnschicht-chromatographie von Nuclein saüre-Derivaten an Anionenaustauscher Schichten. *Angew. Chem.,* 1961, **73,** 436-439.

[174] Randerath K. — Dünnschicht-chromatographie von Nuclein saüre-Derivaten an Anionenaustauscher Schichten. *Angew. Chem.,* 1961, **73,** 674-671.

[175] Randerath K. et Struck H. — Dünnschicht-chromatographische Trennung von Nucleinsaüre Derivaten an Celluloseschichten. *J. Chromatog.,* 1961, **6,** 365-367.

[176] Reed C.F., Swisher S.N., Marinetti G.V. et Eden E.G. — Studies of the lipids of the erythrocyte. I. Quantitative analysis of the lipids of normal human red blood cells. *J. Lab. Clin. Invest.,* 1960, **56,** 281-289.

[177] Reichstein S. — Eluotrope Reihe der Lösungsmittel. *Helv. Chim. Acta,* 1952, **35,** 64-70.

[178] Reio L. — A Method for the paper chromatographic separation and identification of phenol derivates, mould metabolites and related compounds of biochemical interest, using a « reference system ». *J. Chromatog.,* 1958, **1,** 338-373.

[179] Reitsemia R.H. — Characterisation of essential oils by chromatography. *Anal. Chem.,* 1954, **26,** 960-963.

[180] Reitsemia R.H. — Chromatoplate technique in essential oil characterisation. *J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed.,* 1954, **43,** 414-416.

[181] Rhodes (D.N.) et Lea (C.H.). — On the composition of hen's egg phospholipids. *Biochem. J.,* 1957, **65,** 526-533.

[182] Rigby F.L. et Bethune J.L. — Components of the lead precipitable fraction of Humulus Lupulus - Adhumolone. *J. Am. Chem. Soc.,* 1955, **77,** 2828-2830.

[183] Ritter F.J. et Meyer G.M. — Preparative thin layer chromatography as an alternative for column chromatography. *Nature*, 1962, **193**, 941.

[184] Robinson N. et Phillips B.M. — Quantitative thin layer chromatography of serum phospholipids. *Clin. Chim. Acta*, 1963, **8**, 385-392.

[185] Rochelmeyer H. — Probleme der Biologischen Synthese der Mutterkornalkaloïde. *Pharm. Ztg*, 1958, **103**, 1269.

[186] Rosi D. et Hamilton P. — A method for the more efficient utilisation of thin layer chromatoplates. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 388.

[187] Rosmus J. et Zdenek D. — Two improved methods for the separation of 2-4 dinitrophenyl hydrazones of carbonyl compounds. *J. Chromatog.*, 1961, **6**, 187-190.

[188] Rouser G., Marinetti G.V., Witter R.F., Berry J.F. et Stotz E. — Paper chromatography of phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 1956, **223**, 485-497.

[189] Rybicka S.M. — Concentration gradient Development in thin layer chromatography. *Chem. and Ind.* (London), 1962, 308-309.

[190] Sambasivarao K. et Mc Cluer R.H. — Thin layer chromatographic separation of sphingosine and related bases. *J. Lipid Research*, 1963, **4**, 106-108.

[191] Schlemmer W. — Determination des phosphatides par chromatographie sur couche mince de gel de silice. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 1961, **37**, 134-137.

[192] Sease J.W. — Use of a fluorescent adsorbent for the chromatography of colorless compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 2242-2244.

[193] Seher A. — Der Analytische Nachweis synthetischer Antioxydantien in Speise Fetten. Dünnschichtchromatographie. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1959, **161**, 345-351.

[194] Seher A. — Analysis of Tocopherol Mixtures with aid of TIC. *Mikrochim. Acta*, 1961, 308-313.

[195] Sims R.P.A. et Larose J.A.G. — The use of iodine vapor as a general detecting agent in the thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1962, **39**, 232-235.

[196] Skidmore W.D. et Entenman C. — Thin layer chromatography of phosphatides. *Feder. Proc.*, 1962, **21**, 292.

[197] Skidmore W.D. et Entenman C. — Two dimensional thin layer chromatography of rat liver phosphatides. *J. Lipid Research*, **3**, 471-475.

[198] Skipski V.P., Peterson R.F. et Barclay M. — Separation of phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidyl-serine and other phospholipids by thin layer chromatography. *J. Lipid Research.*, 1962, **3**, 467-470.

[199] Skipski V.P., Peterson R.F., Sanders J. et Barclay M. — Thin layer chromatography of phospholipids using silicagel without sulfate binder. *J. Lipid Research.*, 1963, **4**, 227-228.

200 Smith L.L. et Foell T. — Thin layer chromatography of steroids on starch bound silicagel chromatoplates. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 339-344.

201 Stahl E. — III. Mitteilung. Einsatzmöglichkeiten in der Reichstoffindustrie. Elutions mitteilwahl, Zirkular und Keilstreifen-Technik. *Parfumerie und Kosmetik*, 1958, **39**, 564-574.

202 Stahl E. — Dünnschicht-chromatographie, eine adsorptions-chromatographische Schnell-methode unter Vesonderer Berücksichtigung der Untersuchung von Lipiden. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1958, **60**, 127.

203 Stahl E. — II. Mitteilung; Standardisierung, Sichbarmachung, Dokumentation und Anwendung. *Chem. Ztg*, 1958, **82**, 323-329.

[204] Stahl E. — Dünnschicht-chromatographie in der Pharmacie. *Pharmazeutiche Rundschau*, 1959, **1**, 1-6.

205 Stahl E. — IV. Mitteilung. Einsatzchema, Randeffekt, saüre und basich Schichten, Stufentechnik. *Archiv. der Pharmazie*, 1959, **292**, 411-416.

206 Stahl E. — Zur Inaktivierung der Pyrethrine am Wirkungsort. *Arch. der Pharmazie*, 1960, **293**, 531-537.

207 Stahl E. — Neue Anwedungsgebiete der Dünnschicht-chromatographie. *Angew. Chem.*, 1961, **73**, 646-654.

208 Stahl E. — Dünnschicht-chromatographie. *Z. Anal. Chem.*, 1961, **181**, 303-312.

209 Stahl E. — Chromatographische Adsorption und einfache Bestimmung von Aktivität von Aluminium oxide. *Chem. Ztg*, 1961, **85**, 371-4.

[210] Stahl E. et Kaltenbach U. — Dünnschicht-chromatographie. VI. Mitteilung. Spurenanalyse von zuckergemischen auf Kieselgur G-Schichten. *J. Chromatog.*, 1961, **5**, 351-355.

211 Stahl E., Schröter G., Kraft G. et Renz R. — Dünnschicht-Chromatographie. *Pharmazie*, 1956, **11**, 633-637.

212 Stanley W.L. et Vannier S.H. — Analysis of Coumarin compounds in Citrus oils by liquid solid partition. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.*, 1957, **40**, 582-588.

213 Strain H.H. — « Chromatographic adsorption analysis ». *Interscience Publishers Inc.*, New York, 1942.

214 Teijgeler C.A. — Dünnschicht-chromatographie. *Pharm. Weekblad*, 1962, **97**, 43-50.

215 Trappe W. — Trennung v. biol. Fettstoffen aus ihren natürlichen durch Anwend v. Adsorptionssaülen. I. Mitteilung. Eluotrope Reihe d. Lösungsmittel. *Biochem. Z.*, 1940, **305**, 150-162.

[216] Trappe W. — Trennung v. biol. Fettstoffen aus ihren natürlichen durch Anwend. v. Adsorptionssäulen. II. Mitteilung. Abtrennung der P und N Freien lipoidfractionen. *Biochem. Z.*, 1940, **306**, 316.

[217] Trappe W. — Eine einfache Methode zur getrennten, quantitativen Bestimmung von freien und verestertem Cholesterin im Blutserum ohne Digitoninfällung und Verseifung. *Z. Physiol. Chem.*, 1942, **273**, 177-190.

[218] Vacikova A., Felt A. et Malikova J. — Chromatography of serum lipid fractions on a thin layer of Al_2O_3. *J. Chromatog.*, 1962, **9**, 301-306.

[219] Valdiguié P., Douste-Blazy L., Mathis R. et Henry L. — Contribution à l'étude des sérolécithines et des ovolécithines par distribution à contre-courant et par spectrographie infra-rouge. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, **42**, 1035-1043.

[220] Van Dam M.J.D., de Kleuver G.J. et de Heus J.G. — Thin layer chromatography of weakly polar steroids. *J. Chromatog.*, 1960, **4**, 26-33.

[221] Van Dam M.J.D. — Chromatographie des cholestérols du sang sur couche mince. *Bull. Soc. Chim. Belges*, 1961, **70**, 122-124.

[222] Vannier S.H. et Stanley W.L. — Fluorometric determination of 7 geranoxycoumarin in lemon oil : analysis of mixtures of grapefruit oil in lemon oil. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 1958, **41**, 432-435.

[223] Viswanathan (C.V.) et Meera Bai B. — Application of reversed phase circular paper chromatography to the analysis of higher fatty acids. *J. Chromatog.*, 1962, **7**, 507-15.

[224] Vogel W.C., Doizaki W.M. et Zieve L. — Rapid thin layer chromatographic separation of phospholipids and neutral lipids of Serum. *J. Lipid Research*, 1962, **3**, 138-140.

[225] Wade H.E. et Morgan D.M. — Fractionation of phosphates by paper ionophoresis and chromatography. *Biochim. J.*, 1955, **60**, 264-270.

[226] Wagner G. — Dünnschicht-chromatographische Trennung für volatil Phenolen. *Pharmazie*, 1955, **10**, 302-304.

[227] Wagner G. — Neure Ergebnisse auf dem Gebiet der Isolierung und analytik von Phosphatiden und Glycolipiden. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1960, **62**, 1115-1123.

[228] Wagner H. — Quantitative Bestimmung von Lecithin und Colamin Kephalin in pharmazeutischen Präparaten mit Hilfe der Dünnschicht-chromatographie. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1961, **63**, 1119-1123.

[229] Wagner H., Horhammer L. et Wolff P. — Dünnschicht-chromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. *Biochem. Z.*, 1961, **334**, 175-184.

[230] Waldi D. — In Dünnschicht-chromatographie Eine Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag. Berlin-Gottingen-Heidelberg, 1962.

[231] Waldi D. — Einfache quantitative Schnellbestimmung von Pregnandiol auf Dünnschicht platten zum Frushschwangerschaftsnachweis und zur überwachung des cyclus bei der Frau. *Klin. Woch.*, 1962, **40**, 827.

[232] Waldi D., Schackerz K., Munter F. — Eine systematische Analyse von Alkaloiden auf Dünnschichtplatten. *J. Chromatog.*, 1961, **6**, 61-73.

[233] Wasicky R. — Thin layer chromatography on microslides. *Anal. Chem.*, 1962, **34**, 1346.

[234] Weicker H. — Adsorptionschromatographische Untersuchung von Serum Lipiden auf Kieselgelplatten. *Klin. Woch.*, 1959, **37**, 763-767.

[235] Wherrett J.R. et Cumings J.N. — Detection and resolution of gangliosides in lipid extracts by thin layer chromatography. *Biochem. J.*, 1963, **86**, 378-382.

[236] Whitehouse M.W., Bresler A.E. et Staple E. — The use of iodine for the detection of lipids. *J. Chromatog.*, 1958, **1**, 385-386.

[237] Williams T.I. — *In* Introduction to chromatography. Blackie and Son, Glasgow, 1947, p. 36.

[238] Witter R.F. et Stone S. — Spot test for 3 hydroxy △-5 steroids. *Anal. Chem.*, 1957, **29**, 156-157.

[239] Wollish E.G., Schmall M. et Hawrylyshyn M. — TLC. Recent developments in equipement and application. *Anal. Chem.*, 1961, **33**, 1138-1142.

[240] Wren J.J. — Chromatography of lipids on silicic acid. *J. Chromatog.*, 1960, **4**, 173-195.

[241] Yamamura J. et Niwaguchi T. — Separation and identification of organic chlorinated pesticids by plate chromatography. *Kagaku Keisatsu Ken Kyusho Hokoku*, 1960, **13**, 450-451; C.A., 1962, **56**, 6416.

[242] Zöllner N. et Wolfram G. — Dünnschichtchromatographische Systeme zur Trennung der Plasmalipoïden. *Klin. Woch.*, 1962, **40**, 1101-1107.

[243] Zöllner N., Wolfram G. et Amin G. — Über die quantitative Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen der cholesterinester. *Klin. Woch.*, 1962, **40**, 273-275.

Table des Matières

I. — **Travaux antérieurs.**

A. HISTORIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE..... 13

B. GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE..... 16

I. Théories.

a) *Chromatographie d'adsorption*..... 16
b) *Chromatographie de partage*..... 19
c) *Chromatographie sur échangeur d'ions*... 20

II. Appareillage et technique.

a) *Matériel.*

1. Supports..... 20
2. Applicateurs..... 21
3. Cuves..... 23
4. Milieu d'adsorption..... 23
5. Solvants..... 29

b) *Technique.*

1. Préparation des chromatoplaques.... 35
2. Dépôt des substances..... 36
3. Saturation des cuves..... 36
4. Développement..... 37
5. Révélation et identification des composés fractionnés..... 38
6. Elution et dosage..... 42
7. Conservation des résultats..... 43

C. ÉTUDE DES LIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE.

I. Données acquises par la chromatographie sur colonne..... 44

II. Chromatographie en couche mince des lipides neutres et de leurs produits d'hydrolyse..... 46

III. Chromatographie en couche mince des lipides complexes.
— Phospholipides. 57
— Glycolipides. 62
IV. Détection des lipides sur couche mince. . . . 64

II. — **Recherches personnelles.**

A. TECHNIQUES.

I. Extraction des lipides. 69
II. Purification des extraits. 72
III. Chromatographie ascendante en couche mince 75
a) *Matériel*. 75
b) *Préparation des plaques*. 76
c) *Dépôt des substances*. 79
d) *Solvants*. 79
e) *Détection et identification*. 81
f) *Evaluation semi-quantitative*. 89
IV. Dosages chimiques.
a) *Cholestérol*. 89
b) *Esters d'acide gras*. 90
c) *Phosphore lipidique*. 92
d) *Bases azotées*. 93
V. Chromatographie sur papier imprégné a l'acide silicique. 93
VI. Expérimentation avec du ^{32}P. 94

B. RÉSULTATS.

I. Lipides sériques. 96
a) *Lipides neutres*. 96
b) *Phospholipides*. 102
c) *Conclusion*. 108
II. Lipides spléniques. 108
a) *Lipides neutres*. 108
b) *Phospholipides*. 110
III. Lipides du jaune d'œuf. 114
IV. Expérimentation avec du ^{32}P. 115

C. CONCLUSIONS. 123

Bibliographie. 125